

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

На правах рукописи

Гаркуша Юлия Юрьевна

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

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Тюменцева И.С.

Ставрополь – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	6
Цель исследования.....	8
Задачи исследования.....	8
Научная новизна исследования.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
Методология и методы исследования.....	11
Материалы.....	12
Штаммы микроорганизмов, использованные в опытах.....	12
Полевой материал.....	16
Лабораторные животные, использованные в экспериментах.....	16
Микробиологические методы исследования.....	16
Физико-химические методы исследования.....	17
Иммунологические методы исследования.....	17
Иммунохимические методы исследования.....	18
Биофизические методы исследования.....	18
Материалы для синтеза композиционных органокремнеземных магноиммуносорбентов (МИС) и физико-химические методы их исследования..	19
Устройства для работы с МИС.....	21
Методы математической и статистической обработки материала.....	22
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	22
Личное участие автора в получении результатов.....	24
Основные положения, выносимые на защиту	25
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	27
1.1. Сорбенты: некоторые их свойства и области применения.....	27

1.2. Дисперсные кремнеземы: их свойства и применение в санитарно-эпидемиологическом мониторинге и лабораторной диагностике инфекционных и других заболеваний.....	36
1.3. Элюция биомолекул с поверхности аффинного сорбента.....	51
1.4. Выбор биологического объекта при конструировании диагностических препаратов.....	55
1.5. Заключение по обзору литературы.....	62
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	65
Глава 2. РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНЫХ УСЛОВИЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА И СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА МАГНОИММУНОСОРБЕНТА.....	65
2.1. Оптимальная последовательность процессов, параметров биотехнологии производства МИС и характеристика конечного продукта	66
2.2. Разработка системы контроля качества МИС.....	76
2.3. Разработка нормативной документации на стандартный образец магносорбента.....	86
2.4. Заключение по главе 2.....	87
Глава 3. ПРИМЕНЕНИЕ МАГНОИММУНОСОРБЕНТОВ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ.....	90
3.1. Разработка производственной технологии туляремийного композиционного аффинного сорбента с магнитными свойствами и внедрение в практику магноиммуносорбентной тест-системы для иммуноферментного анализа возбудителя туляремии.....	90
3.1.1. Получение биологического сырья (специфических антигенов, туляремийной антисыворотки).....	90
3.1.2. Получение диагностических иммуноглобулинов для иммуноферментного анализа.....	95
3.1.3. Конструирование тест-системы магноиммуносорбентной для выявления возбудителя туляремии в ИФА.....	105
3.2. Испытание магноиммуносорбентов в полевых условиях.....	111

3.3. Методологические приемы и устройства для забора, транспортировки проб при экологическом, микробиологическом, эпидемиологическом мониторинге объектов окружающей среды.....	113
3.4. Заключение по главе 3.....	117
ГЛАВА 4. ОТРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЭЛЮЦИИ АНТИГЕНА С ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНОЙ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ МАТРИЦЫ.....	119
4.1. Разработка методов десорбции антигенов с поверхности магнитоуправляемых микроразмерных частиц для их детекции в серологических и генетических исследованиях.....	120
4.2. Разработка набора реагентов магноиммуносорбент туляремийный с элюирующим буфером.....	128
4.3. Заключение по главе 4.....	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	133
ВЫВОДЫ	143
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	145
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	146
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ И ЕДИНИЦ.....	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	149
ПРИЛОЖЕНИЯ	184

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Одной из главных задач в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний и санитарно-эпидемиологическом надзоре является быстрое выявление патогена бактериальной или вирусной природы [2,10]. 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). При проведении лабораторного анализа подобного материала использовались различные приемы и методы очистки и концентрирования: фильтрация, центрифугирование, флотация и другие, требующие для выполнения специального оборудования и значительного времени проведения анализа, при этом возникали сложности соблюдения противоэпидемического режима работы при выполнении этих манипуляций при подозрении на инфицированность возбудителями особо опасных инфекций.

Оптимальным решением этого вопроса явилось применение различных сорбционных материалов, в том числе сорбентов с магнитными свойствами и фиксированными на их поверхности специфическими антителами (магноиммуносорбентов) [68,166].

В качестве матрицы в системах иммуномагнитной сепарации использовали целлюлозу, полистирол, агарозу, акриламид, поливинил, хитин и другие полимерные материалы с применением оксидов железа, никеля [190].

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 [27].

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.

Для унификации производственного выпуска диагностикумов, основанных на сорбционной технологии, необходимо разработать стандартные условия биотехнологических процессов. Одним из важных направлений в проведении стандартизации является создание стандартных образцов (СО), предназначенных для воспроизведения единиц величин, характеризующих состав и свойства всех компонентов, значения которых предварительно установлены в результате метрологической аттестации [23, 24]. 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 микропланшет, 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) 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 [4,41]. 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 [4,7,22]. 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 [165,179].

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 [1,64,101,139].

Для удобства проведение 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 [108]. 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 [189,209,210].

Опыт применения магноиммуносорбентов 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 [3,13,31,66,67,70,101,164].

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 (МИС).

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 стандартизирован 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 непрямой гемагглютинации и реакции агглютинации латекса (патент РФ на изобретение № 2535070 от 10.12.2014 г.).

Разработана биотехнология производства туляремиального 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. Научная литература, посвященная свойствам и применению дисперсных кремнеземов в санитарно-эпидемиологическом мониторинге и лабораторной диагностике инфекционных и других заболеваний, была проанализирована формально-логическими методами. В исследованиях использованы биотехнологические, микробиологические, иммунохимические, физико-химические методы, с последующей современной компьютерной статистической обработкой результатов.

Материалы

Штаммы микроорганизмов, использованные в опытах

При выполнении работы были использованы 29 штаммов микроорганизмов разных родов и видов, характеристика которых приведена в таблице 1. Штаммы микроорганизмов были получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Таблица 1 - Характеристика штаммов микроорганизмов, использованных в работе

№ п/п	Наименование микроорганизмов и обозначение штамма	Характеристика штаммов		
		морфологические и тинкториальные свойства	культуральные свойства	биохимические свойства
1	2	3	4	5
1-10	<i>Francisella (F.) tularensis</i> Miura, , Schu, 83 ery ^s , 325/1765, 543/6, 503/840, 122, 319/38, 144/713, 15 НИИЭГ (ЖТВ)	Грамотрицательные коккобактерии размером 0,3-0,5 мкм. Неподвижные, спор не образуют. Могут образовать нестойкую капсулу в живом организме.	Аэробы. На глюкозо-цистеиновом агаре рН 7,2-7,4 при обильном посеве через 2 сут. инкубации при температуре 37 °С культуры дают пышный сливающийся серовато-голубоватого оттенка, умеренно блестящий слизистый рост. В жидкой глюкозо-цистеиновой среде растут в виде пленки при равномерном помутнении среды.	Ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу. Не образуют индола. Белки ферментируют с образованием сероводорода.
11-14	<i>Yersinia (Y.) enterocolitica</i> 64, 178, 383(9), 124	Грамотрицательные кокковидные палочки.	Через 24 ч роста на плотных питательных средах при температуре (24 ± 1) °С образуют мелкие колонии, которые увеличиваются в размерах через 2 сут.	Ферментируют арабинозу, сорбит, арабитол, арбутин, ксилозу; сероводород не образуют.
15-16	<i>Salmonella (S.) typhimurium</i> 7407, 9640	Небольшие грамотрицательные палочки. Подвижны, имеют перитрихальные жгутики. Не кислотоустойчивы. 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 черные со светлым ободком, блестящие.	Желатины не разжижают, индол не образуют, нитраты не редуцируются, продуцируют сероводород. Молоко не свертывают. Ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, левулозу, галактозу, арабинозу, мальтозу, декстрин, маннит, сорбит, инозит. Ферментируют с образованием кислоты глицерин.

1	2	3	4	5
17-18	<i>Escherichias (E.) coli</i> SA-11, 113-3	Прямые палочковидные бактерии, размером 1,1-1,5-2,0-6,0 мкм. Располагаются в мазках поодиночке или парами. Имеется капсула, подвижны (перитрихии), спор не образуют. Грамотрицательные.	Факультативные аэробы. Температура роста 37 °С. На МПА растут в виде слабо выпуклых сероватых колоний, в бульоне вызывают диффузное помутнение с образованием осадка.	Желатины не разжижают, нитраты редуцируются в нитриты, образуют индол. Молоко свертывают. Ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, левулозу, галактозу, арабинозу, лактозу, мальтозу, раффинозу, декстрин, манит, салицин, дульцин и сорбит.
19-22	<i>Brucella (B.) melitensis</i> 16-M, 14, 93, Rev-1	Мелкие коккобактерии, величиной 0,3-0,5 мкм. Неподвижны, не образуют спор. Красятся всеми анилиновыми красками, грамотрицательные.	Строгие аэробы. Наилучшая питательная среда – печеночный 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 рН среды 6,6-7,4 и температуре 37 °С образуют круглые, выпуклые, гладкие, блестящие, гомогенные или нежнозернистые колонии. На бульоне – помутнение. Не лизируются бактериофагом ТБ.	Желатины не разжижают, не образуют сероводород, не свертывают молоко, не расщепляют углеводов. Тионин и основной фуксин 1:25000 не оказывают бактериостатического действия. Индол не образуют. Нитраты не редуцируют. Мочевина редуцируется до аммиака.

1	2	3	4	5
23-26	<i>B. abortus</i> 544, 82, 272, 19 ВА	Мелкие коккобактерии, величиной 0,3-0,5 мкм. Неподвижны, не образуют спор. Красятся всеми анилиновыми красками, грамотрицательные.	Первые генерации требуют повышенного содержания в атмосфере CO ₂ . При последующих пересевах CO ₂ – 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 1:250000 не задерживает роста; тионин 1:250000 действует бактериостатически. Мочевина и аспарагин редуцируются до аммиака.
27-29	<i>B. suis</i> 1330, 461, 61	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 свертывают молоко. Тионин 1:250000 не оказывает влияния на рост м.к., основной фуксин 1:250000 действует бактериостатически.

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.

Клещей систематизировали согласно определителям Б.И. Померанцева [138], Н.Н. Плавильщикова [133]. Клещей хранили до момента подготовки проб живыми при температуре 2-8 оС в увлажненных энтомологических пробирках (не более недели) или замораживали в жидком азоте.

Лабораторные животные, использованные в экспериментах

В опытах были использованы 50 кроликов обоего пола породы «Шиншилла», массой 3-3,5 кг. Кроликов получали из питомника Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и после карантинизации использовали в опытах. Содержание животных соответствовало «Положению о контроле качества лабораторных животных питомников и экспериментальных клиник (вивариев)» [81,136]. Работу с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации [101,139] и Директивой Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [56, 148].

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°С на

плотной питательной среде Ft-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Стерилизацию бактериальных масс *F. tularensis* осуществляли двойным объемом холодного ацетона (минус 40 °С) в течение 24 ч [121].

Гетерологичные штаммы микроорганизмов (*Y. enterocolitica* 64, 178, 383(9), 124, *B. melitensis* 16-М, 14, 93, Rev-1, *B. abortus* 544, 272, 19 ВА, *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) °С [154].

Физико-химические методы исследования

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли по [206] на аппарате с вертикальными гелевыми пластинами LKB (Швеция).

Определение электрофоретической подвижности белковых фракций [229].

После электрофореза проводили измерения общей длины геля (L_1) и расстояния от верха геля до середины фракции краски-свидетеля (l_1). Затем после окрашивания и отмывки несвязавшегося красителя измеряли вторично общую длину геля (L_2) и расстояние от верха геля до середины интересующей белковой фракции (l_2). Электрофоретическую подвижность (Rf) рассчитывали по формуле, предложенной К. Weber и М. Osborn [229]:

$$Rf = \frac{l_2}{L_2} \times \frac{L_1}{l_1} \quad (1)$$

Иммунологические методы исследования

Методы контроля антигенов и сывороток

Постановку реакции иммунодиффузии (РИД) проводили по O. Ouchterlony [209] на предметных стеклах или в чашках Петри в 1 % агаровом геле (Difco, USA). Окраску линии преципитации осуществляли амидошварцем 10 Б.

Контроль титра специфических антител в сыворотках определяли в реакции непрямой иммунофлуоресценции (НРИФ) по Т.Н. Weller, А.Н. Coons [232]. Микроскопию препаратов осуществляли в падающем отраженном свете в люминесцентном микроскопе «Primo-Star iLED» (Германия). За положительный результат принимали яркую (4+, 3+) флуоресценцию периферии микробных клеток.

Иммунохимические методы исследования

Выделение иммуноглобулинов

В работе применили метод фракционирования белковых смесей высоко-молекулярным, незаряженным, линейным полимером – полиэтиленгликолем (ПЭГ – 6000) по А. Polson, G.M. Potgier, J.E. Largier [211].

Получение и контроль иммуноферментных конъюгатов

Иммунпероксидазные конъюгаты получали методом периодатного окисления по Р.К. Nakane, А. Kawaoi [207] в модификации М.В. Wilson, Р.К. Nakane [233].

Рабочий титр и специфическую активность конъюгатов определяли по методике М. Clark и А. Adams [182] в «сэндвич»-варианте ИФА.

Биофизические методы исследования

Количественное определение белка

Количественное определение белка проводили по методу О. Warbur и W. Christian [229] сравнением поглощения белков при 280 и 260 на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония) [140]. Концентрацию белка вычисляли по формуле 2:

$$C_{\text{белка}} \text{ (мг/мл)} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260} \quad , \text{ где} \quad (2)$$

A_{260} и A_{280} – показатели поглощения при длине волны λ ;
1,55 и 0,76 – постоянные коэффициенты.

Лиофилизация биологического материала

Лиофилизацию проводили в сушке лиофильной камерного типа ЛС-500 (Россия). Готовые препараты разливали в ампулы, замораживали в

низкотемпературном столе «Elcold» (Дания) при температуре минус (45 ± 5) °С не менее 18 ч. Высушивали в сушильной камере под вакуумом (Рисунок 1).

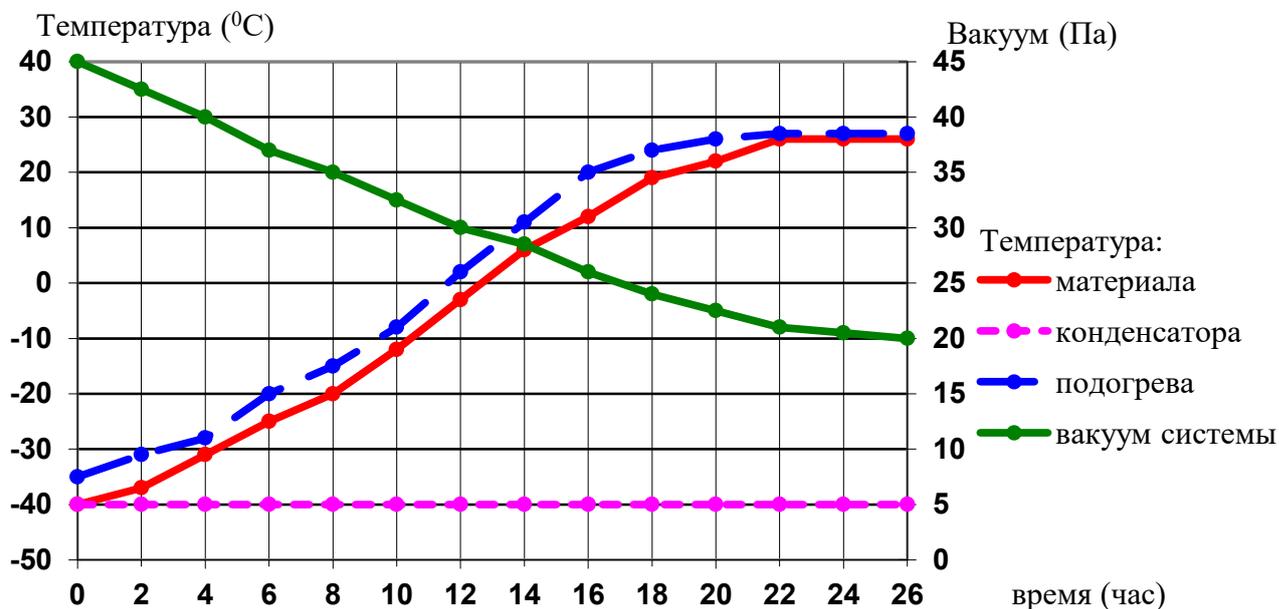


Рисунок 1 – Параметры лиофильного высушивания биологического сырья и иммунобиологических препаратов

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

В качестве основной матрицы использовали алюмосиликат (ТУ 6-09-01-356-76), представляющий собой тонкодисперсный продукт, содержащий в своем составе двуокись кремния алюминия (насыпная плотность – 320 кг/м^3), влажность при температуре 110 °С (массовая доля) – 3,5 %; содержание SiO_2 (массовая доля) – 85-90 %, содержание Cl в пересчете на NaCl – 0,2 %, содержание SO_3 – 0,6 %.

Модификаторами сорбентов являлись: декстран (полиглюкин) – полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, соединенных 1,6-гликозидгликозными связями (молекулярная масса декстрана 60000 ± 10000), а также вторичный алкилсульфат натрия (ТУ 38-10719-77). Магнитным материалом служил оксид железа (ГОСТ 4173-77 ч.д.а.), основного вещества 98,7 %.

Удельную поверхность магносорбента определяли по методу А.А. Клячко-Гурвича [84], основанному на низкотемпературной адсорбции азота.

Суммарный объем и радиус пор определен по методу Н.В. Кельцева [83]. В основе метода лежит измерение объема воды, использованного на смачивание образца сорбента, предварительно высушенного до влажности менее 3 %. Для определения суммарного объема пор (EV) использовали формулу:

$$EV = \frac{v}{M}, \quad (3)$$

где v – объем воды, пошедший на смачивание навески сорбента, мл

M – масса навески, г.

Средний радиус пор (нм) рассчитывали по формуле:

$$r_{cp} = \frac{2 \times 10^3 EV}{S_{уд.}}, \quad (4)$$

где EV – суммарный объем пор, см³/г; S – удельная поверхность сорбента, м²/г.

Количественную оценку магнитных свойств магносорбента проводили вибрационным методом [134]. Для чего сорбент закрепляли на конце тонкого стержня из немагнитного материала, который с помощью цангового зажима соединялся с вибрационной системой, приводящей образец в колебательное движение. Образец магносорбента располагался между четырьмя измерительными катушками, которые неподвижно закреплялись на полюсах электромагнита. Магнитный момент сорбента определяли по магнитному моменту эталона – пластинки из никеля.

Расчет удельной намагниченности определяли по формуле:

$$M_{уд.} = \frac{E_{обр.} \times m_{эт.}}{\quad} \quad (5)$$

$$E_{\text{эт.}} \times m_{\text{обр.}}$$

где $E_{\text{эт.}}$, $m_{\text{эт.}}$ – электродвижущая сила (ЭДС) и масса эталона;

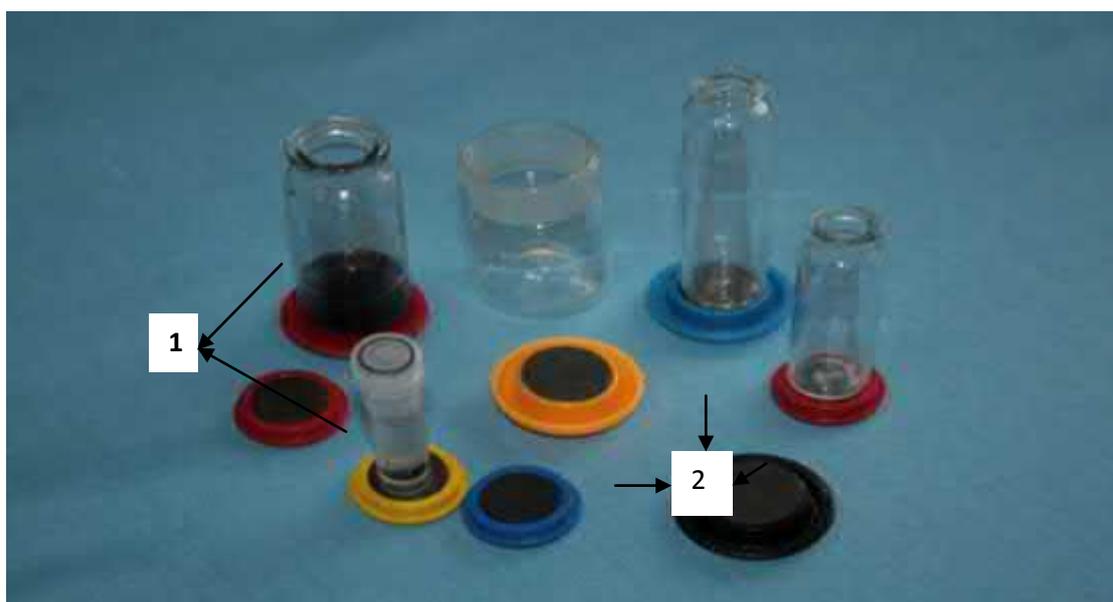
$E_{\text{обр.}}$, $m_{\text{обр.}}$ – ЭДС и масса сорбента.

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

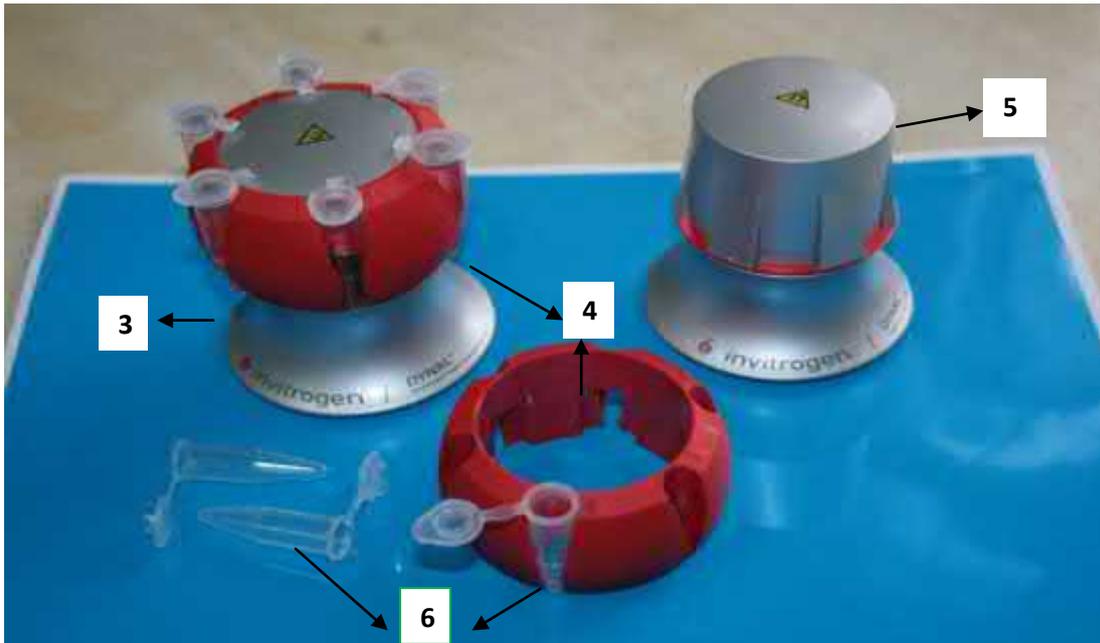
Микроструктуру сорбента исследовали на сканирующем электронном микроскопе IMZ-T 3000 (Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ, разрешении 70 А° и увеличении в 10000 раз. Навески сорбента по 20 мг помещали в специальный держатель из латуни, покрытый слоем графита. Затем образец вводили в вакуумный пост прибора и на поверхность наносили слой никеля толщиной 80-100 А°, после этого проводили исследование микроструктуры как описано в работе [169].

Устройства для работы с МИС

После доставки проб в лабораторию при работе с магнимоносорбентами используют различные стеклянные (полимерные) флаконы и постоянные магниты (Рисунок 2А). Более удобно проводить манипуляции с применением магнитного сепаратора, например, Дупа Mag-Spin («Introgen Дупа AS», Норвегия) (Рисунок 2Б).



A



Б

Рисунок 2 – Сепарация МИС с помощью различных устройств

Примечание * 1 – стеклянные и полипропиленовые флаконы разного объема; 2 – постоянные магниты; 3 – магнитный сепаратор Dyna Mag-Spin в сборе; 4 – съемный штатив; 5 – магнитный корпус; 6 – полипропиленовые микроцентрифужные пробирки, 1,5 мл

Методы математической и статистической обработки материала

Для подтверждения воспроизводимости и достоверности результатов, полученных при исследовании, применяли статистические методы [156].

Математическую обработку результатов экспериментов проводили на компьютере (программа EXCEL). Расчет значения средней квадратичной ошибки отдельного измерения (S), выборочной дисперсии (S^2), вероятного квадратичного отклонения среднеарифметического ($E_{0,95}$) проводили по формулам 3, 4, 5:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (C_i - C)^2}{n-1} \quad (3) \quad S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (C_i - C)^2}{n-1} \quad (4) \quad E = \frac{t_{\alpha} S}{\sqrt{n}} \quad (5), \text{ где}$$

C_i – изменение опыта;

$(C_i - C)$ – разность между изменениями;

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

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).

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 туляремиальных 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 – 1×10^2 м.к./мл.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Сорбенты: некоторые их свойства и области применения

Сорбенты, используемые в научной и производственной сферах, имеют различные состав и свойства и могут различаться также по ряду других признаков. По физическому состоянию сорбенты могут быть в виде порошков, гранул, геля, пасты, взвеси, коллоида и т.д. По химической природе (структуре) сорбенты можно разделить на несколько групп: природные неорганические минералы, природные органические материалы, синтетические сорбенты.

К первой группе можно отнести глинистые сорбенты, представляющие собой высокопористые образования, минералы гематит, кальций, цеолитовый туф и др., смешанные бинарные сорбенты на основе глинистых материалов, например, каолинит/монтмориллонит, каолинит/гематит [9, 11]. Строение глинистых материалов показывает, что слоистые продукты могут иметь жесткую (каолинит, диккит, слюда, пиррофиллит, тальк) или расширяющуюся (монтмориллонит, вермикулит) решетку. В любой пористой системе промежутки между частицами образуют извилистую систему пор с чередующимися расширениями и сужениями. В расширениях ведут несколько проходов (горло коры) из соседних подобных объемов (Рисунок 3) [19].

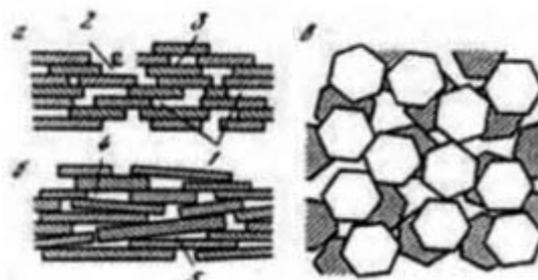


Рисунок 3 – Схема образования пор в пластинчатых минералах: а, б – разрез минерала; в – вид сверху [19]

Примечание* 1 – щелевидные поры; 2 – лабиринтообразные поры; 3 – замкнутые поры; 4, 5 – клиновидные поры

Предложенные классификации пористых тел исходят из экспериментальных данных по размеру пор или их фракционному составу, но они не отражают происхождения и строения пористых тел. По размеру

пор пористые сорбенты разделяют по эффективному радиусу ($r_{эфф}$): макропоры с $r_{эфф} \geq 100$ нм; мезопоры с $r_{эфф} 1,5-100$ нм; микропоры с $r_{эфф} \leq 1,5$ нм. Существует также разделение пористых тел по конфигурации пор (Таблица 2) [19].

Таблица 2 – Основные виды реальных пористых тел [19]

Форма пор	Описываемые моделью системы
Глобулярная	Сажи, аэросилы, аморфные и кристаллические ксерогели и различные порошки с частицами не очень вытянутой и плоской формы, байеритная гидроокись алюминия и полученный из нее оксид (вторичные поры), металлические напыленные пленки, пористые кристаллы, песок
Щелевидные	Каолинит, диккит, тальк, пирофиллит, слюды, гидрослюды, монтмориллонит, вермикулит, каналы сажи (поры в частицах), активированный уголь (микропоры), окись железа (микропоры), Al_2O_3 (первичные поры), окись магния (первичные поры) графит, окись графита, порошки из пластинчатых кристаллов
Поры между круглыми стержнями	Гели пятиоксида ванадия, бемитная гидроокись алюминия, $\gamma-Al_2O_3$, $\alpha-Fe_2O_3$ (вторичные поры), гели оксида вольфрама, диоксид циркония, палыгорскит и сепиолит (вторичные поры), хризолитовый асбест (вторичные поры)
Цилиндрические капилляры	Энделлит, галлуазит, палыгорскит и сепиолит (первичные поры), анодные и окисноалюминиевые пленки
Бутылкообразные	Пористые стекла, активированный уголь (мезо- и макропоры), восстановленный оксид железа, скелетные катализаторы

Природные материалы широко изучаются с целью использования их в качестве сорбентов для очистки питьевой воды, технологических и сточных вод, как эффективные биоиндикаторы экологической чистоты лито-, гидро- и атмосферы, как эффективные адсорбенты ионов различных металлов и химических соединений [7, 8, 9, 19, 36, 37, 59, 72, 77, 79, 137, 157, 173, 187, 188, 192, 201, 202, 225].

Известны природные органические сорбенты на основе пищевых волокон, лигнина гидролизного, хитина, пектинов и альгинатов (микрористаллическая целлюлоза – МКЦ, Полифепан, Мультисорб, Экстралакт, Альгисорб и др.). По физико-химическим свойствам пищевые

волокна подразделяют на растворимые в воде (пектины, камеди, слизи, фракции гемицеллюлозы), их условно называют «мягкими» волокнами, и нерастворимые (целлюлоза, часть гемицеллюлозы, лигнин), так называемые «грубые» волокна.

Пищевые волокна – полисахариды и лигнин. Природные пищевые волокна не перевариваются пищеварительными ферментами, не усваиваются пищеварительной системой человека, ферментируются кишечными бактериями. Важнейшее свойство пищевых волокон – способность активно впитывать и удерживать воду (адсорбция) и другие вещества: нитриты, нитраты, канцерогенные вещества, бактериальные токсины.

По селективности различают сорбенты неселективные, селективные монофункциональные, селективные би- и полифункциональные.

Виды пищевых волокон:

– Целлюлоза представляет собой неразветвленный полимер глюкозы, содержащий до 10 тысяч мономеров. Разные виды целлюлозы обладают разными свойствами и различной растворимостью в воде.

– Гемицеллюлоза образована конденсацией пентозных и гексозных остатков, с которыми связаны остатки арабинозы, глюкороновой кислоты и ее метилового эфира. Также как и целлюлоза, разные типы гемицеллюлозы обладают различными физико-химическими свойствами.

– Гумми (камеди) являются разветвленными полимерами глюкуроновой и галактуроновой кислот, к которым присоединены остатки арабинозы, маннозы, ксилозы, а также соли магния и кальция; содержатся в основном в морских водорослях и семенах.

– Слизь (нейтральные и кислые) представляют собой разветвленные сульфатированные арабиноксиланы; являются полисахаридами семян и морских водорослей.

– Пектины – комплекс коллоидных полисахаридов, в основе которых галактуроновая кислота с боковыми цепями из рамнозы, арабинозы, ксилозы

и фруктозы. Пектиновые вещества входят в состав клеточных стенок и межклеточного вещества высших растений. Пектины являются желирующими веществами, они легко подвергаются бактериальному расщеплению в толстой кишке.

– Альгинаты – соли альгиновых кислот, молекула которых представлена полимером полиуроновых кислот, в большом количестве содержащихся в бурых водорослях. Альгинаты обладают способностью связывать и выводить из организма радионуклиды и тяжелые металлы.

– Лигнин является полимерным остатком древесины после ее перколяционного гидролиза, который проводится с целью выделения целлюлозы и гемицеллюлозы.

– Хитин ($C_8H_{13}NO_5$)_n, Мм 203,2 г/моль (от др. греческого хитон – одежда, оболочка) – природное соединение из группы азотсодержащих полисахаридов, основной компонент экоскелета (кутикулы) членистоногих и ряда других беспозвоночных, входит в состав клеточной стенки грибов и бактерий. Систематическое наименование – Поли-(N-Ацетил-1,4-β-D-Глюкопиранозамин). Структура хитина была открыта А. Hofman в 1929 г. Хитин – один из наиболее распространенных в природе полисахаридов: каждый год на Земле в живых организмах образуется около 10 миллиардов тонн хитина. Хитин не растворим в воде. При нагревании с концентрированными растворами минеральных кислот (соляной или серной) происходит гидролиз, в результате образуются мономеры N-ацетилглюкозамина, а при длительном нагревании хитина с концентрированными растворами щелочей происходит N-деацетилирование и образуется хитозан. Ферменты, расщепляющие β (1-4) гликозидную связь в молекуле хитина, называются хитозанами.

Хитозан – полностью деацетилированный продукт – поли [(1-4)-2-амино-дезоксид-Д-глюкозы]. Хитозан, в отличие от хитина, растворим в разбавленных растворах кислот, из которых он может быть выделен без

изменений. В работе К.Д. Жоголева, В.Ю. Никитина, В.И. Цыган [73] показано, что раствор солянокислого хитозана обладает структурной вязкостью. Исследования информационного поведения кристаллического хитозана в виде ацетатной соли свидетельствуют о существовании четырех гидратированных и одной безводной фазы. Аминная группа сообщает хитозану полиэлектролитные свойства [167, 168]. Наличие в структурных звеньях хитозана двух гидроксильных и первичной аминогруппы расширяет возможности его модификации [236].

Ведущую роль в мире по исследованию хитозана и хитина, производству данных полисахаридов занимает Япония. Именно в Японии в 1972 году впервые в мире начато производство хитозана, которое к настоящему времени достигло около 2000 тонн в год. В США выпускается свыше 700 тонн хитозана в год, и, по мнению американских экспертов, называющих хитозан «полимером XXI века», мировой рынок продукции на основе хитозана в данном столетии будет носить глобальный характер, а широкое распространение в природе позволяет рассчитывать на значительную сырьевую базу промышленного значения.

В настоящее время известно более 70 направлений использования хитина и хитозана и их производных в различных отраслях промышленности. Основным потребителем хитозана является здравоохранение, на долю которого приходится до 65 % производимого хитозана. Далее следует сельское хозяйство (12 %), утилизация отходов и очистка сточных вод (7 %), пищевая промышленность (5 %), косметическая промышленность (5 %).

Углеродные сорбенты на основе активированного угля, гранулированных углей, ультрадисперсных углей, углеволокнистых материалов, графита поглощают газы, соли металлов, продукты метаболизма бактерий, вирусов (токсины), продукты метаболизма лекарств и самих лекарств [6, 53, 92, 96, 105, 120, 123, 143, 162, 163].

Активированные угли давно и широко применяются в промышленности, медицине, ветеринарии, экологии и др. В качестве сырья в производстве активированного угля используют каменный уголь, битумный уголь, древесину, скорлупу кокосовых орехов и т.п. Сырье сначала обугливают, затем подвергают активации. Сущность активации состоит во вскрытии пор, находящихся в углеродном материале в закрытом состоянии. Это делается либо термохимически (предварительно пропитав раствором хлорида цинка, карбоната калия и др. и нагревают без доступа воздуха), либо путем обработки перегретым паром или углекислым газом, или их смесью при температуре 800-850 °С. В результате поверхность гранул приобретает сложную организацию (Рисунок 4), при этом пористая структура углей характеризуется наличием развитой системы пор (Рисунок 5), которые классифицируются по размерам: микропоры – 20 \AA ; мезопоры – $20-500 \text{ \AA}$; макропоры – $500 \text{ \AA} \geq$.



Рисунок 4 – Трехмерное представление образца углеродного сорбента (атомно-силовая микроскопия) [85]

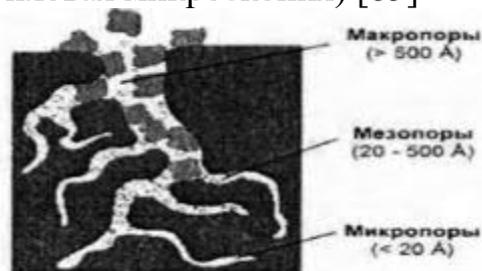


Рисунок 5 – Структура пор активированного угля [105]

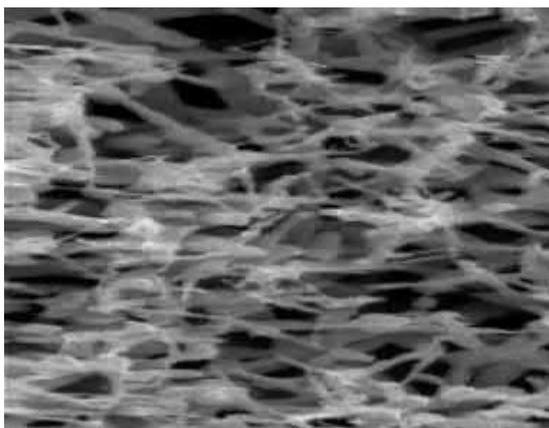
Для высокодисперсных углеродных сорбентов характерна большая удельная поверхность, так, у ультрадисперсного кислородсодержащего графита в виде вспученных частиц слоистого графита удельная поверхность – $1500-2000 \text{ м}^3/\text{г}$ при размере частиц 25-50 мкм [105, 124].

На основе микрогранулированных (ультрадисперсных) матриц путем иммобилизации на их поверхности различных белковых молекул (иммуноглобулинов, антигенов, ферментов и т.п.) получены иммуносорбенты для специфического выделения (сепарации) различных «целевых продуктов» [123, 129, 143, 144, 145].

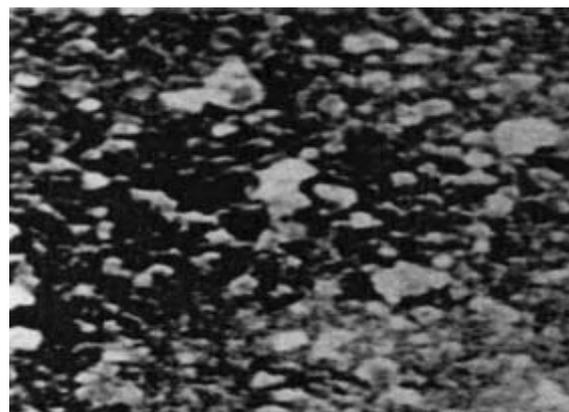
В последние десятилетия появился ряд научных публикаций, посвященных получению и применению ультрадисперсных алмазов (наноалмазов) в качестве сорбентов в биологии и медицине [57, 78, 177, 190, 196, 211].

Кремнийсодержащие сорбенты. Среди кремнийсодержащих сорбентов различают природные и синтетические. Из природных наиболее известны цеолиты, глины, взвеси которых обладают адсорбирующими свойствами [150, 175].

Синтетические сорбенты применяются как в медицине – смектиты (смекта), монтлорилониты натрия (бетонит), аэросил (А 380), так и в других областях биологии и биотехнологии – силикагель (продукт поликонденсации ортокремниевой кислоты) (Рисунок 6а, б), силохром, аэросилогели [2, 22, 60, 95].



а



б

Рисунок 6 – Микрофотографии поверхности микрочастиц силикагеля (а, увеличение $\times 500$) и силихрома С 120 (б, увеличение $\times 10000$) [68]

Сорбенты химического происхождения. К этой группе относят микро, – наночастицы, синтезированные на основе веществ различной химической

природы и способные адсорбировать целевые объекты неорганической и органической природы. Довольно часто применяют сверхсшитые полимеры стирола, полистирола [5, 6, 117, 118, 203], сополимера дивинилбензола, полиакролеина [147], полианилина [124, 199].

С 70-х годов прошлого столетия активно применялись сорбенты (иммуносорбенты), полученные на основе полиакриламидного геля в микробиологических и клинических исследованиях. Сорбенты получают методом эмульсионной полимеризации геля, для которого требуется специализированное оборудование и строгое соблюдение ряда параметров реакции. Обладая рядом особых свойств (химической стабильностью и инертностью, прозрачностью, лабильностью структуры, отсутствием адсорбции, устойчивостью к изменению рН и температуры, нерастворимостью в большинстве растворителей), полиакриламидные гели нашли широкое применение в качестве основы при приготовлении магнитных сорбентов. Такие магноиммуносорбенты использовали для концентрирования и выделения различных микроорганизмов из загрязненных микрофлорой окружающей среды и биологических жидкостей [51]; для диагностики и лечения ревматических заболеваний [50]. Магноиммуносорбенты позволяли значительно улучшить целый ряд этапов анализа антигенов, а в ряде случаев повысить качественные характеристики методов. Отмечена высокая воспроизводимость результатов, возможность проведения анализа с большим количеством проб, снижение трудоемкости процессов и высокая корреляция с другими современными методами анализа.

Однако опыт экспериментально-производственного освоения диагностикумов магноиммуносорбентных на основе полиакриламида на базе лаборатории диагностических препаратов Ставропольского научно-исследовательского противочумного института показал, что недостатками указанных препаратов являются длительность и многостадийность их

получения, использование дорогостоящих импортных высокотоксичных реактивов, потеря ими биологических свойств при лиофилизации [164].

К сожалению, ограниченный объем данного раздела не позволяет подробно охарактеризовать все группы (виды) сорбентов. Выше мы изложили некоторые сведения о сорбентах, которые наиболее часто используют в лабораторной практике в биологии и медицине и других отраслях науки и производства. Их применяют для выделения (сепарации) объектов абиотической и биотической природы, идентификации, используют в различных методах диагностики: бактериологическом [63, 64, 212, 214], иммуноферментном анализе [2, 12, 52, 98, 109, 123, 145], полимеразно-цепной реакции [31, 191, 195, 204], хемилюминисценции [82], количественном иммунофлуоресцентном анализе [65, 164].

В настоящее время широко обсуждается вопрос о критериях оценки сорбентов различного назначения, применяемых в медицинской практике (гемо-, энтеросорбция) [102]. Для сорбентов выдвинуты следующие требования: высокая адсорбционная емкость в отношении широкого спектра биологических объектов; антитоксичность; отсутствие повреждающего действия в отношении сорбируемых биообъектов; механическая прочность; возможность стерилизации; химическая инертность; стабильность свойств при хранении; доступность сырья для их производства.

По нашему мнению, в наибольшей степени этим требованиям отвечают кремнеземные сорбенты. Существующие проблемы в лабораторной практике связаны с выбором видов кремнеземов, способами оптимального модифицирования их поверхности для иммобилизации специфических лигандов – антигенов, антител, ферментов и т.п.

1.2. Дисперсные кремнеземы: их свойства и применение в санитарно-эпидемиологическом мониторинге и лабораторной диагностике инфекционных и других заболеваний

В современной биотехнологии широко используются различные материалы, область применения которых определяется их свойствами по отношению к клеткам и биомолекулам с определенной структурой. Здесь особое место принадлежит высокодисперсным формам кремнезема – селикагелю, аэросилу, пористому стеклу и др. Такие сорбенты можно разделить на несколько групп, каждая из которых, в свою очередь, подразделяется на типы. Классификация сорбентов может основываться на ряде признаков. Общепринятым является разделение сорбентов на группы по химической природе матрицы (основы) сорбента, а по типам – по методу химической обработки матрицы, делающей ее пригодной для использования в определенном виде исследований.

Основными группами сорбентов являются: 1) поверхностно-пористые сорбенты, представляющие собой непроницаемое для растворителя твердое ядро из стекла, на поверхность которого занесен тонкий слой пористого адсорбента, обычно селикагеля; 2) пористые сорбенты на основе селикагеля; 3) пористые сорбенты на полимерной основе.

Сорбенты первой группы представляют собой стеклянные микрошарики размером 35-50 мкм, на поверхности которых различными способами закрепляют слой селикагеля или оксида алюминия толщиной в 1-2 мкм. Этот слой может использоваться для разделения методом адсорбционной хроматографии, либо модифицироваться нанесением подвижной фазы. Нанесение фазы возможно динамическим методом из растворителя, методом испарения раствора фазы; наноситься могут индивидуальные вещества или же их полимеры; наконец, фазами могут служить химически привитые пленки как в виде монослоев (щеточные сорбенты), так и в виде полимерных пленок разной толщины.

Создание этих сорбентов, называемых также пелликулярными, позволило заполнять сухим способом достаточно длинные эффективные колонки и проводить разделения разного типа достаточно быстро. Обычно эффективность составляла для колонок длиной 1-2 м при продолжительности анализа 20-80 мин. Недостатки физически нанесенных фаз стимулировали быстрое развитие методов химической прививки фаз, далее широко использовавшихся для других групп сорбентов.

Наряду с достоинствами поверхностно-пористых сорбентов (возможность упаковки в колонки сухим способом, легкость фракционирования, широкий ассортимент привитых и нанесенных фаз) обнаружили их серьезные недостатки. Главным следует считать малую ёмкость по пробе, связанную с малой поверхностью сорбента в колонке (основной объем сорбента занимает непористое ядро, не участвующее в разделении), большое гидравлическое сопротивление длинных колонок, их малую производительность и быструю перегрузку в препаративной работе, сложную технологию получения сорбентов и их высокую цену, недостаточную эффективность колонок и длительность анализа.

В настоящее время поверхностно-пористые сорбенты практически не используют для аналитической работы. Единственная область применения, которая для них сейчас осталась, – это использование в предколонках. Предколонки устанавливают перед аналитической колонкой для улавливания необратимо сорбируемых загрязнений из проб, особенно в медицине и биологии.

Силикагель представляет собой почти чистый диоксид кремния – SiO_2 , однако технические его сорта содержат примеси. Силикагель всегда содержит большие или меньшие количества адсорбированной воды (на этом основано его широкое использование в качестве осушителя). Кроме того, технический силикагель содержит другие оксиды, прежде всего оксид алюминия, также железа, который придает техническому силикагелю

желтоватый или даже коричневый цвет. Силикагель имеет разную поверхность, составляющую обычно 100-600 м²/г, и значительный объем пор (0,5-1,2 мл/г) с преобладанием пор диаметром от 5 до 15 нм.

Силикагель – продукт поликонденсации ортокремниевой кислоты, которая образуется из силиката натрия при его обработке водным раствором. Метод прокаливания широко применяется для пассивации пористых кремнеземов [21]. Для увеличения размера пор в структуре силикагеля его подвергают гидротермальной обработке при различных температурах при давлении водяного пара. Силикагель имеет глобулярную структуру, т.е. представляет собой комплекс частиц, от размера и плотности, упаковки которых зависит величина его удельной поверхности, объем пор и размеры.

В дальнейшем были разработаны способы получения силикагелей специально для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) путем направленного формования в процессе синтеза силикагеля микросфер нужной фракции с преобладанием частиц размером 3-12 мкм (фирмы «Дюпон», «Мерк», «Мэчери-Нэгель», «Фейз Сепарейшн», «Сепарейшн Груп», «Шендон Сауренс» и др.) под торговыми марками соответственно зорбакс, лихросфер, нуклеосил, сферисорб, видак, хайперсил. Регулированием процессов формования микросферического силикагеля и его отверждения, сушки, последующей химической обработки получается широкая гамма сорбентов для ВЭЖХ зернением 3, 5, 7 и 10 мкм с узким фракционным составом. Если процесс формирования не позволяет получить сразу узкую фракцию микросфер, их подвергают воздушному сепарированию, также как и размолотый кусковой силикагель.

В настоящее время разные фирмы производят более 200 сорбентов для ВЭЖХ на основе силикагеля как с неправильной формой частиц, так и в виде микросфер. Ассортимент их непрерывно расширяется за счет появления новых привитых фаз к известным силикагелям для ВЭЖХ или же новых вариантов прививки тех же фаз, появления новых силикагелевых матриц с

более широкими порами или более узко сепарированных, появление новых фирм-производителей.

Химия поверхности силикагеля для ВЭЖХ независимо от способа его получения примерно одна и та же. Поверхностный слой силикагеля в дальнейшем работает как адсорбент или же служит той матрицей, к которой прививают химически неподвижную фазу. На поверхности силикагеля, таким образом, можно обнаружить несколько видов групп, способных к взаимодействию с веществами в процессе последующего хроматографического анализа или в процессе прививки неподвижной фазы. Прежде всего, это может быть силанольная группа со свободным гидроксилом (тип I). Во-вторых, это может быть силанольная группа, свободный гидроксил которой образует с соседним атомом кислорода за счет его неподеленной пары электронов водородную связь (тип II), при этом образуется устойчивый шестичленный цикл. В-третьих, это может быть силоксановый мостик, который образуется за счет отщепления молекулы воды от двух силанольных групп (тип III). Последний тип связи может за счет обратимой реакции гидролиза превратиться в две силанольные группы (тип I).

Количество групп как силанольных, так и силоксановых на единицу массы силикагеля зависит от ряда факторов. Так, чем больше удельная поверхность силикагеля (она меняется в пределах от 1000 до 15 м²/г), тем больше групп обоих типов находится на сорбенте в колонке и, следовательно, сильнее удерживание взаимодействующих с ними веществ. Далее, в процессе получения силикагеля он подвергается сушке, от длительности и условий которой зависит соотношение силоксановых и силанольных групп. При сушке геля поликремневой кислоты – исходного продукта для силикагеля – сначала идет поликонденсация с выделением воды и образованием жесткого скелета силикагеля. При нагревании до 200 °С вся физически сорбированная вода удаляется, а поверхность остается полностью

гидроксильной, т.е. количество силанольных групп будет максимальным, а силоксановых – минимальным. Если продолжить нагревание, силанольные группы начнут отщеплять воду с образованием силоксановых групп; этот процесс заканчивается примерно при 1000 °С. Дальнейшее нагревание приводит к спеканию частиц силикагеля с уменьшением как объема пор, так и размера частиц, а затем и к плавлению с образованием кварца.

Силанольные группы, располагающиеся на поверхности силикагеля, обладают слабокислыми свойствами и способны поэтому сильнее удерживать вещества с основными свойствами. Силоксановые группы могут в процессе работы за счет гидролиза переходить в силанольные, что меняет свойства поверхности сорбента и удерживание вещества.

Аэросил – пирогенная форма двуокиси кремния, полученная в результате высокотемпературного парафазного гидролиза четыреххлористого кремния в токе кислорода, с последующей конденсацией в парах воды. Методом ядерного магнитного резонанса показано, что объемная фаза аэросила представлена в равной степени структурными мотивами кварца и кристоболита. Эти представления были подтверждены методом инфракрасной (ИК) спектроскопии.

Наибольшей химической однородностью обладают аэросилогели (силохромы), получаемые спеканием частиц непористого высокодисперсного диоксида кремния – аэросила. Был предложен способ получения синтетических макропористых аэросилогелей. Данные сорбенты имеют крупные поры. Проводя их термообработку, добиваются получения сорбентов с узким распределением по размерам пор.

Синтез кремнеземных носителей позволяет получить сорбенты, которым присущи положительные свойства неорганических матриц: химическая чистота, гидрофильность, отсутствие набухаемости в растворах,

значительная адсорбционная емкость, отсутствие токсичности, жесткость остова, химическая и микробиологическая устойчивость.

Для выяснения особенностей поверхностной структуры кремнезёмов (Рисунок 7) проведено большое число исследований [25, 26, 159, 160, 161, 174].

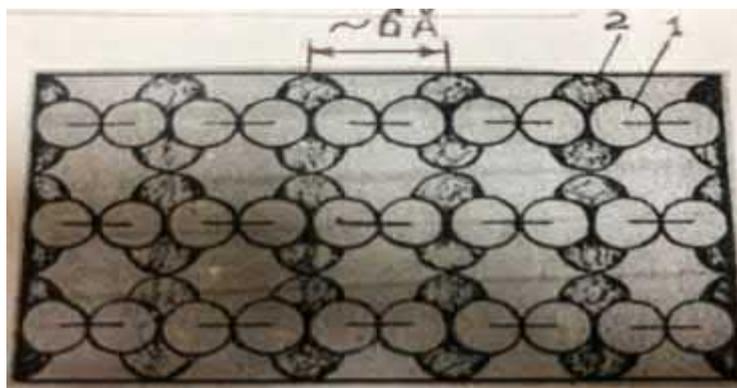


Рисунок 7 – Строение фрагментов поверхности SiO_2 со структурой граней (100) [174]

Примечание* 1 – атомы кислорода силанольных групп, 2 – силоксановых связей

На поверхности кремнезема в различных соотношениях могут находиться 5 видов групп: 1 – свободные, отдельно стоящие – ОН группы; 2 – физически связанная вода – молекулы воды, имеющие водородные связи с силанольными группами; 3 – дегидратированные оксиды – силоксановые группы; 4 – геминальные гидроксилы, связанные с одним атомом кремния; 5 – вицинальные гидроксильные группы, связанные друг с другом водородной связью.

Поверхность кремнеземных сорбентов содержит большое число силанольных (SiOH) и силоксановых групп (Si-O-Si) и гидротирована. Связанная с кремнеземом вода находится не в виде кристаллогидрата, а входит в состав силанольных групп, покрывающих частицы диоксида кремния. Исследования дали ответы на важные вопросы, связанные со строением гидроксильных групп кремнезёмов, их распределением и активностью [158].

Гидроксильные группы и являются основным типом реакционных центров, по которым происходит модифицирование поверхности кремнезема.

Под этим понятием подразумевается процесс изменения химического состава поверхностного слоя в заданном направлении. В настоящее время усилиями многих исследователей проведено значительное число химических превращений с участием центров поверхности кремнезема. Разнообразие реакций химического модифицирования поверхности кремнезема связано с многосторонностью решаемых практически важных задач, при этом приемы часто более напоминают химию органическую, чем неорганическую.

Закрепленные на поверхности кремнеземов химические радикалы с функциональными различными группами ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CN}$ и др.) открывают перспективы в направлениях синтеза новых специфических сорбентов [41].

Большое число химических превращений, осуществляемых на поверхности кремнезема, предложено разделить по механизму на два класса.

К первому классу относят большую группу реакций, протекающих с процессом замещения протона поверхностной силанольной группы такими электрофильными реагентами, как хлоралкоксисиланы элементоорганические соединения, галогениды металлов. Установлено, что реакционная способность гидроксильных групп в реакциях электрофильного замещения протона определяется эффективным положительным зарядом на центральном атоме атакующей молекулы, а также величиной нуклеофильного содействия со стороны уходящей группы.

Ко второму классу реакций с поверхностью кремнеземов относят реакции нуклеофильного замещения гидроксильных групп и нуклеофильного присоединения при расщеплении связи у поверхности кремния анионами галогенидов и спиртами. Как указано в работе В.А. Тертых, В.В. Павлова, К.И. Ткаченко [158], механизм нуклеофильного замещения включает стадию образования промежуточного циклического комплекса, последующее перераспределение связей, что приводит к конечному продукту реакции. Как отмечают авторы, образование промежуточного комплекса энергетически

выгодно, так как сводит к минимуму пространственное разделение зарядов при вытеснении уходящей группы.

Существуют химические реакции на поверхности кремнезёмов, начальная стадия которых протекает по механизму электрофильного замещения протона в силанольной группе, а затем образующиеся соединения претерпевают перегруппировки, соответствующие процессу нуклеофильного замещения у атома кремния. К таким реакциям относят взаимодействие дисперсных кремнезёмов с хлористым тиоилом [158].

Примеси оксида Al, Fe и других металлов приводят к образованию на сорбирующей поверхности электронноакцепторных (Льюисовских) и протонодонорных (Бренстедоновских) центров. Адсорбционная активность исходных кремнезёмных адсорбентов определяется центрами нескольких типов: ионизированными и неионизированными силанольными группами, полярными силоксановыми группами и примесями оксидов металлов [171, 223].

Структура такого алюмосиликата (или так называемого цеолита 5 А) напоминает ряд «птичьих клеток», связанных друг с другом со всех шести сторон (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Атомная структура алюмосиликата [171]

Каждая «клетка» открывается в соседнюю «клетку» отверстием, позволяющим небольшим молекулам типа линейных углеводов проходить сквозь трехмерный каркас клеток. Благодаря этой особенности

структуры, подобные алюмосиликаты (цеолиты) способны адсорбировать большое количество веществ с небольшим молекулярным весом.

Для практического использования кремнеземных адсорбентов важен вопрос гидролитической устойчивости привитого модификатора, что может быть достигнуто введением в кремнеземный образец ионов металла. Механизм фиксации основан на образовании сорбционных координационных комплексов, состоящих из ионов металла (как правило, Fe, Ni, Cu, Al, Zn), с поверхностными группами носителя [21, 226].

При получении кремнеземных носителей для иммобилизации белков широко используется метод молекулярного наслаивания. Материалы, полученные методом молекулярного наслаивания, приобретают целый ряд новых свойств: устойчивость в кислой среде, повышенную адгезивность и прочность (на 40-50 %). Методом молекулярного наслаивания достигнута возможность регулирования физико-химических свойств поверхности, таких как кислотность, каталитическое изменение реакционной способности привитых органофункциональных групп.

Ф. Ходж [171] в своей работе описал способы получения амино- и ольфинозамещенных функциональных групп на поверхности кремнезема посредством обработки силанольных групп различными спиртами.

Для синтеза поверхностных карбоксильных групп аминоксодержащие кремнеземы модифицируют ангидридами кислот или обрабатывают глутаровым альдегидом. Данные способы отличаются простотой и увеличивают емкость сорбентов.

Часто гидроксильные группы, находящиеся на поверхности кремнезема, активируют бромцианом в водной среде [230]. Галоидалкил, введенный на поверхность адсорбента, способен алкилировать молекулы белков по аминогруппам, фенольному гидроксилу и сульфгидрильным группам [172].

Структура привитого слоя ослабляет неспецифические полярные взаимодействия, целенаправленно усиливает сорбционные свойства кремнеземных адсорбентов и придает им дополнительные функциональные группы, способные к электростатическим биоспецифическим, гидрофобным и другим взаимодействиям.

Для практических целей медицины, ветеринарии, биотехнологии биологически активных веществ важное значение в настоящее время приобретают композиционные сорбенты. А.В. Брыкаловым [27, 28, 119] предложено разделить способы синтеза данных сорбционных материалов на четыре группы: адсорбция или хемосорбция полимеров из растворов на поверхности кремнеземов, имеющих определенные структурные характеристики; радикальная или ионная полимеризация мономеров в присутствии кремнеземного носителя; поликонденсация кремнийорганических соединений с целью получения объемомодифицированных композиционных сорбционных материалов [171]; получение композиционных аффинных сорбентов химической сборкой структурных единиц и методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии полимеров и высокоселективных лигандов [10, 24, 68, 70, 99].

Достоинство первого способа заключается в его простоте, однако возникают сложности с регулированием толщины полимерного покрытия и кроме того, подобные сорбенты отличаются нестабильностью при многократном использовании, поскольку возможна десорбция полимера с поверхности кремнезема. К недостаткам композиционных сорбентов, получаемых методом прививочной полимеризации, нужно отнести нестандартность их состава и физико-химических свойств, в связи с тем, что как линейные и разветвленные макромолекулы, так и микроскопические трехмерные частицы сшитого геля способны адсорбироваться на поверхности кремнезема во время синтеза. Четвертый способ одновременно

позволяет направленно создавать заданную геометрическую структуру сорбента, а также осуществлять активирование поверхности модификатором органической природы.

В последнее время значительно повысился интерес к получению высокодисперсных кремнийсодержащих материалов с перспективами их широкого применения в промышленности, фармацевтике, медицине, ветеринарии и т.д. [139]. Одним из источников диоксида кремния предложена рисовая шелуха (РШ), содержащая его до 90-98 %. Предложена кавитационная технология наноструктурирования РШ, которая является комбинацией механохимического синтеза, ударно-волнового воздействия, высокотемпературного синтеза (пиролиза) с мгновенной закалкой целевого продукта, элементный состав которого показал присутствие двух элементов кремния и кислорода, что свидетельствует о получении чистого диоксида кремния [18].

Высокодисперсные органокремнеземы с модифицированной поверхностью нашли применение в биотехнологии получения лекарственных препаратов пролонгированного действия [4], иммобилизационных ферментов [29, 30], аминокислот [14], аминокислот и иммуноглобулинов [193].

Дополнительные удобства и значительные преимущества перед общепринятыми методами появились с началом использования сорбентов с магнитными свойствами, которые применяют в качестве твердой фазы для селективного концентрирования на их поверхности различных антигенов и микроорганизмов [183, 202, 224]. По своей структуре магнитные сорбенты могут быть простыми, состоящими лишь из магнитного порошка или гранул, на поверхности которых тем или иным способом иммобилизован лиганд, и сложными, представляющими собой полимерную основу, в которой фиксирован магнитный материал. В качестве магнитных материалов чаще используют природный магнит, феррит, мелкие металлические частицы

железа, никеля, кобальта, их сплавы, а также осажденные из солей оксида железа: FeO , Fe_2O_3 , Fe_3O_4 [6, 61, 88, 178, 197, 234].

Для придания сорбентам биоспецифических свойств в структуру или на их поверхность иммобилизуют различные лиганды (бактериальные клетки или их фрагменты, антигены, иммуноглобулины, ферменты, ингибиторы, ганглиозиды и т.д.). Способы иммобилизации лигандов на твердофазных носителях подразделяют на ковалентные, ведущие к образованию химической связи при участии неспаренных электронов, принадлежащих обоим партнерам по реакции; физические, к которым относятся приемы механического включения лигандов в матрицу носителя, и адсорбционные методы. Последний тип связи обеспечивается путем адсорбции лиганда в основном за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. Минимальное количество лиганда, необходимое для приготовления аффинного сорбента, простота его получения способствовали широкому распространению адсорбционного метода. Однако такие сорбенты имеют малую емкость и теряют специфическую активность в процессе хранения вследствие непрочной связи лиганда с носителем.

После присоединения аффинного лиганда к инертному носителю перед сорбцией очень полезно определить долю молекул, ковалентно присоединившихся к матрице. Приготовленный аффинный сорбент не должен содержать непрореагировавших реакционно способных групп, которые следует удалить (блокировать), чтобы исключить дальнейшее неспецифическое связывание. Например, если аффинный лиганд связывается своими аминокетильными группами, в качестве инактивирующих агентов наиболее часто используют низкомолекулярные первичные амины. Особенно важно, чтобы все молекулы аффинного лиганда (антигена, антитела и др.), которые не присоединились к носителю ковалентной связью, были тщательно отмыты. Поскольку ионные и водородные связи, гидрофобные взаимодействия и силы Ван-дер-Ваальса-Лондона могут в различной степени участвовать в

связывании комплементарных участков аффинного лиганда и выделяемых веществ (биомолекул), в каждом случае должны быть свои оптимальные условия для сорбции и десорбции [227].

Обладая рядом особых свойств (химической стабильностью и инертностью, лабильностью структуры, отсутствием агрегации, устойчивостью к агрессивным средам, изменениями рН и температуры, нерастворимостью в большинстве растворителей и т.д.), различные матрицы сорбентов нашли широкое применение в качестве основы при приготовлении магнитных сорбентов.

Принцип иммуномагнитной сепарации (сорбции) искомого патогена (микробов, вирусов, грибов), целевой биологической субстанции (антитела, токсина, фермента и пр.) и ее применение в санитарно-эпидемиологическом мониторинге, лабораторной диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний представлены на рисунках 9 и 10 [157, 205].

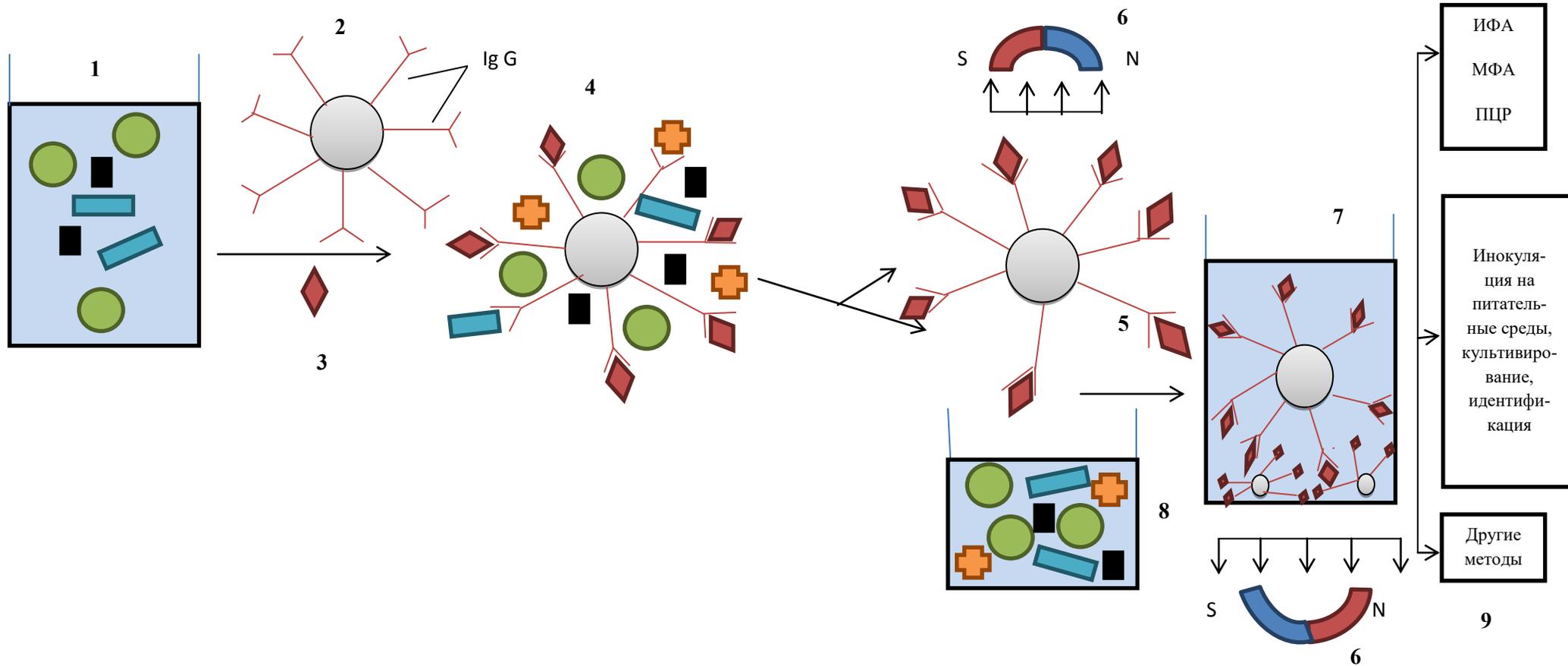


Рисунок 9 – Принцип иммуномагнитной сепарации [157]

Примечание * 1 – исследуемая проба; 2 – супермагнитная частица с лигандом (магноиммосорбент); 3 – целевой патоген (антиген); 4 – распознавание «цели» (реакция антиген-антитело); 5 – концентрация целевого патогена и его сепарация под действием постоянного магнитного поля; 6 – постоянный магнит; 7 – отмывание исследуемого образца от ингибирующих примесей; 8 – исследуемая проба после иммуномагнитной сепарации; 9 – индикационные методы



Рисунок 10 – Основные стратегии применения иммуномагнитной сепарации в санитарно-эпидемиологических исследованиях и лабораторной диагностике инфекций [205] (с нашими уточнениями и дополнениями)

Такие магноиммуносорбенты использовали для концентрирования и выделения различных микроорганизмов из загрязненных микрофлорой объектов внешней среды и биологических жидкостей [64, 65, 164, 186], в прямом и непрямом иммунофлуоресцентном [38, 64, 65, 135] и иммуноферментном анализах [65], для диагностики и лечения ревматических заболеваний [50, 122].

Отмечена высокая воспроизводимость результатов, возможность проведения анализа с большим количеством проб, снижение трудоемкости процессов и высокая корреляция с другими современными методами анализа.

Используя известные принципы получения композиционных сорбентов, в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте впервые разработана технология получения композиционных иммуносорбентов с магнитными свойствами [165].

В качестве структурных единиц, формирующих остов кремнезема, использовали пирогенную форму диоксида кремния (аэросил А-380) и магнитный порошок. Модифицирование матрицы проводили декстраном, бензохиноном с последующим ковалентным связыванием белкового лиганда [68, 69, 164].

С целью упрощения способа получения магноиммуносорбента впервые разработана биотехнология органокремнеземного магносорбента на основе синтетического кремнезема – алюмосиликата, модифицирование поверхности которого осуществляли в присутствии декстрана и вторичного алкильсульфата натрия [10, 70].

1.3. Элюция биомолекул с поверхности аффинного сорбента

Исследования в области магноиммуносорбентов привели к созданию и внедрению в практику тест-систем магноиммуносорбентных для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций в иммуноферментном анализе. Использование таких сорбентов позволяет исследовать в ИФА пробы с высокой степенью загрязнения, неограниченного

объема, с низкой концентрацией патогена, чувствительность при этомкратно превышает традиционный метод анализа [165]. Для постановки серологических и молекулярно-генетических реакций (РНГА, РАЛ, ПЦР) с целью детекции селективно сконцентрированного на магноиммосорбенте патогена необходимо провести элюцию антигенов с магнитной иммобилизованной матрицы и регенерацию МИС с целью многократного его использования. Это обеспечивает сокращение материальных и трудовых затрат и позволяет исследовать элюированный антиген в различных методах лабораторного анализа.

С целью оптимизации условий элюции и сохранения целостности возбудителя необходимо проверить и учесть значительное количество параметров: состав и свойства самой матрицы; рН, молярность и объем элюентов; температурные и временные характеристики инкубации. Для элюции патогена применяют различные реагенты и методики. Их разнообразие зависит от природы используемой матрицы, элюируемого патогена и цели элюирования.

Элюция может быть специфическая (введение конкурентного вещества) и неспецифическая (изменение параметров элюирования: рН буфера, ионной силы, полярности или добавление в него органического растворителя, что ослабляет взаимодействие антигена с антителом).

Кремнеземные сорбенты можно рассматривать как сорбенты смешанного типа: сорбция в слабокислых и нейтральных условиях происходит в основном за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий, а десорбция при повышении рН (для кислых и нейтральных белков выше значений изоэлектрической точки) в значительной степени за счет отталкивания отрицательно заряженного белка и сорбента. Показано, что для белков с разным значением молекулярной массы: менингококковая IgA-протеиназа-лизостафин-авидин-лизоцим (рН соответственно равен 7,4; 9,5; 10; 11,5) значением рН десорбции увеличивается от 9,0 до 11,2. Для белков с рН ~ 9,5 и выше

уменьшить значение рН десорбции можно, как было показано для лизоцима, повышением ионной силы элюирующего раствора. Таким образом, белки можно очистить, элюируя примеси при нейтральных и слабощелочных значениях рН. При рН 9-10 целевые белки элюируют, увеличивая ионную силу. При этом ферментативная активность, как правило, уменьшается не более чем на 15 % [22].

А.В. Тимофеева с соавт. [163] показали, что десорбция таких сложных биомолекул, как антибиотики (эремомидин, ванкомицин, ристомидин А, тейкопланин А2), относящиеся к гликопептидам, могут быть успешно элюированы с ультрадисперсного углеродного сорбента при использовании органических растворителей: диметилсульфоксида, изопропанола, третичного бутилового спирта, тетрагидрофурана в смеси с 0,5 М уксусной кислотой, причем наиболее эффективную элюцию подбирали индивидуально для каждого антибиотика.

Элюентами белковых молекул могут служить растворы мочевины, детергентов, кислот, щелочей с определенным значением рН. Высокие концентрации солей и низкий рН могут вызвать денатурацию антигена и выпадение его в осадок из раствора. Неионные (Твин, Тритон X-100, NP-40) или цвиттер-ионные (CHAPS) детергенты обычно сохраняют нековалентные белок-белковые взаимодействия. Ионные детергенты (SDS, дезоксихолат натрия) обычно имеют денатурированный эффект на белок-белковые взаимодействия и могут также повлиять на способность антител распознавать белок-мишень. Изменяя молярность, рН элюентов, можно добиться необходимой селективности разделения. Некоторые авторы рекомендуют проводить элюцию 4 М раствором гуанидина на 0,05 М глициновом буфере с рН 3,5 или 0,2 М уксусной кислотой [215], 0,2 М уксусной кислотой с 3 М раствором натрия хлорида. Хороший выход антител можно получить, используя ступенчатую или градиентную элюцию HCl-глициновым буфером с рН 2,5 и 3 М раствором тиоциана аммония [185].

Т.Ю. Русанова с соавт. [149] отмечают, что зачастую удается ограничиться сравнительно мягкими воздействиями: 1М и менее раствор NaCl, 4-6 М растворы мочевины, изменение pH в пределах 4-10, менее 1 % неионного детергента, до 10 % диоксана или 50 % этиленгликоля. Однако в случае сильного аффинного средства этого может быть недостаточно, и приходится использовать гуанидинхлорид или хаотропные агенты, например, тиоционат калия. В этом, да и во всех остальных случаях неспецифической элюции, экспериментатор не должен упускать из поля зрения возможности необратимой денатурации очищаемого белка или белкового лиганда. Нередко приходится искать компромисс между эффективностью элюции и опасностью денатурации. По этой причине элюированный препарат следует немедленно путем диализа или гельфильтрации перевести в подходящий буфер, а сорбент промыть. Выяснение эффективности того или иного метода неспецифической элюции можно провести, как обычно, с помощью предварительных опытов в пробирках.

Многие авторы отмечают, что элюирующий реагент должен быть достаточно сильным, чтобы разрушить связь гомологичных антител с антигенами, и, в то же время, он не должен повредить связь антител с магнитной матрицей. И.Н. Матвеева с соавт. [127] рекомендуют использовать в качестве элюирующего буфера 0,1 М раствор глицина-HCl, pH 2,4 с последующей немедленной нейтрализацией 1 М раствором NaOH. К.В. Курищук с соавт. [126] предлагают использовать 0,05 М ацетатный буферный раствор при pH 5,5, содержащий 0,2 М раствор натрия хлорида. Л.А. Иголкина с соавт. [80] элюцию проводили 0,1 М ацетатным буфером с добавлением 25 % изопропанола и 75 % 1 М раствора KCl. Некоторыми авторами в качестве возможных элюентов апробированы ацетонитрил и этанол [149]. Литературные источники освещают еще множество растворов, которые можно применить при элюировании, например: 0,1 М раствор яблочной кислоты и 0,1 N раствор муравьиной кислоты. Из щелочных

растворов целесообразно применение 0,2 N раствора гидроксида натрия. Также рекомендуют использовать в качестве элюирующего буфера 10мМ трис-НСl, рН 8,0 с 1 мМ ЭДТА.

C. Schneider et al. [221] антигены с иммуносорбента элюировали 0,05 М диэтиламиноом (рН 11,5) в присутствии 0,5 % дезоксихолата. E. Knight, Jr. & D. Fahey [200] концентрированный раствор очищенного интерферона элюировали 40 % этиленгликолем. R.J. Rascati, P. Parsons [214] предложили проводить элюирование 1 % раствором Тритона X-100.

Вышеизложенное демонстрирует достаточно широкий спектр элюирующих буферов. Важными составляющими эффективной элюции является сохранение активности, специфичности элюированного антигена и антител, иммобилизованных на магнитной матрице [116, 200, 213, 220].

1.4. Выбор биологического объекта при конструировании диагностических препаратов

При конструировании диагностических препаратов необходимо опираться на сведения об уровне заболеваемости различными инфекциями, в том числе и природно-очаговыми (ПОИ). Так, в 2018 г. в Российской Федерации зарегистрировано 17212 случаев заболеваний ПОИ. Ежегодно регистрируется туляремия, лептоспироз, бруцеллез, клещевой боррелиоз, кишечный иерсиниоз, Ку-лихорадка и др. Территория юга европейской части России (Южный федеральный и Северо-Кавказский округа) является эндемичной по широкому спектру природно-очаговых инфекций бактериальной и вирусной природы. В 2018 г. на юге РФ выявлено 1037 случаев заболевания ПОИ [32, 33, 34, 35, 90, 91]. Свое внимание мы остановили на туляремийной инфекции, актуальной не только для юга России, но и для всей территории РФ [107, 109, 110, 112]. В связи с этим, мы сочли необходимым и логичным привести некоторые сведения в пользу нашего выбора.

Для проведения экспериментальной работы в качестве модели мы избрали туляремийную инфекцию и ее возбудителя – *Francisella tularensis*,

относящегося ко II группе патогенности (высококонтрагиозных бактериальных заболеваний человека), выделение и идентификация которого может производиться в специально оборудованных лабораториях подготовленными специалистами, вакцинированными против туляремии (СП 1.3.3118-13.-2014) [15, 58]. Этот выбор неслучаен: туляремия – зооноз, поражающий более 150 видов грызунов, относится к природно-очаговым особо опасным инфекционным заболеваниям с широким распространением на всей территории Российской Федерации природных очагов различной топологии, в том числе вовлеченных в сферу хозяйственной деятельности человека. Природные очаги туляремии обладают исключительной стойкостью, их периодическая активизация подтверждается обнаружением *F. tularensis* в естественных «урбанизированных» биоценозах [17, 74, 87, 131, 132, 176].

Возбудитель туляремии (*Francisella tularensis*) относится к роду *Francisella* [112], семейство до настоящего времени не определено. Вид *F. tularensis* представлен следующими подвидами: *F. tularensis* subsp. *nearctica*, *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica*, *F. tularensis* subsp. *holartica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*.

Возбудитель туляремии – очень мелкая (0,2-0,7 мкм) коккобактерия с выраженным полиморфизмом, спор не образует, жгутиков не имеет, капсулу не образует, но продуцирует большое количество слизи. Хорошо окрашивается всеми анилиновыми красками. Не окрашивается по Граму. В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза, отличается от других микробов более нежной фиолетовой окраской.

Возбудитель туляремии – строгий аэроб. На простых питательных средах (типа мясопептонного агара) не растет. Медленно размножается на желточной среде Мак-Коя и на других специальных питательных средах (Емельяновой, Анциферова, FT- агаре, Френсиса, АДЭТ и др.). На среде Мак-Коя через 48 часов при 37 °С туляремийный микроб растет в виде

сплошного, блестящего, сливающегося с цветом среды налета, так называемая «шагреньевая кожа».

Туляремийный микроб высоко устойчив к низким температурам. В замороженных трупах белых мышей, зараженных туляремийным микробом, он выживает около 6 месяцев, в зараженных и замороженных блохах – около года, в зараженных и замороженных клещах – около 500 дней. В зараженных соломе и зерне при 5 °С туляремийный микроб сохраняется до 200 дней. Прямые солнечные лучи убивают возбудителя туляремии через 20-30 минут. Кипячение вызывает немедленную гибель, нагревание при 60 °С вызывает гибель возбудителя через 20 минут, а при 56 °С – через 30 минут.

К особенностям туляремийного микроба относится высокая устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином и полимиксину. Этот возбудитель чувствителен к антибиотикам группы аминогликозидов, тетрациклиновой группы, фторхинолонам.

Туляремия передается человеку контактным (при вскрытии грызунов, при контакте с зараженной водой), алиментарным (при употреблении загрязненной грызунами пищи и воды) и аспирационным путем (при вдыхании пыли, например, при обмолоте загрязненных зерновых культур). Возбудитель может передаваться также кровососущими и другими членистоногими (клещами, блохами, комарами, слепнями, мухами-жигалками). Человек при туляремии является «эпидемиологическим тупиком», то есть от человека человеку туляремия не передается.

Эпидемиологически туляремия характеризуется возможностью возникновения не только единичных или групповых заболеваний, но и значительных эпидемий. Клинически туляремия протекает как общее острое инфекционное заболевание токсико-аллергического, реже септического характера.

Благодаря проведению в стране с середины 40-х – начала 50-х годов прошлого века плановой иммунизации населения высокоэффективной

вакциной, созданной в 40-х годах Н.А. Гайским и Б.Я. Эльбертом [42,43, 44], заболеваемость туляремией в России не отличается высокими цифрами и болеют в основном не привитые люди. За период с 1992 г. в стране ежегодно регистрировали от 50 до 150 больных туляремией без учета заболеваемости в 2005 г., когда впервые за последние 40 лет зарегистрирован 881 больной (подъем заболеваемости составил 6,7 раза) в 35 субъектах РФ [16]. Большая часть случаев отмечалась летом, когда произошли трансмиссивные вспышки, охватившие шесть областей: Воронежскую (35 случаев), Рязанскую (135 случаев), Владимирскую (40 случаев), Московскую (403 случая, включая г. Москву), Нижегородскую (130 случаев), Свердловскую (33 случая). Факторами передачи возбудителя были вода и кровососущие двукрылые (в основном слепни), ведущий механизм передачи – трансмиссивный, реже – контактный [104].

Анализ литературы позволил представить визуализацию медианных уровней заболеваемости туляремией в РФ за 2005 – 2018 гг. (Рисунок 11).

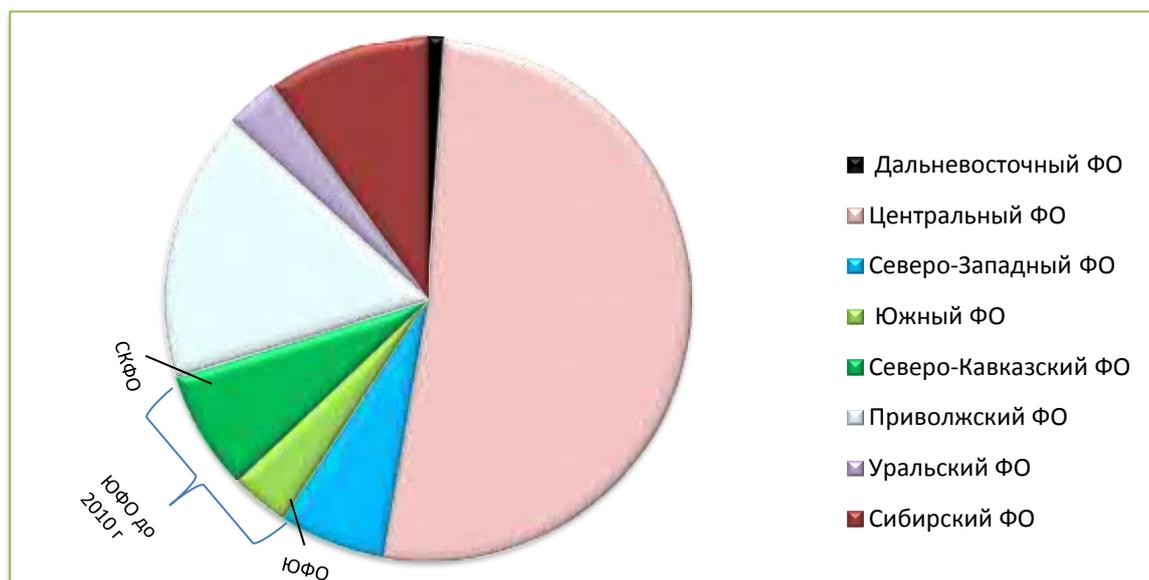


Рисунок 11 – Медианные уровни заболеваемости туляремией в РФ за 2005-2018 гг.

Как видно из рисунка, сделанного на основе анализа литературы [33, 34, 35, 47, 48, 54, 55, 75, 76, 97, 103, 104, 111], наибольшее число больных туляремией зарегистрировано в Центральном федеральном округе, на них приходилось 52 % от заболеваемости в РФ. В Южном федеральном округе

(ЮФО), в состав которого в настоящее время входят: республика Адыгея, республика Калмыкия, республика Крым, город федерального значения Севастополь, Астраханская, Волгоградская, Ростовская области, Краснодарский край, выявлено 11 % больных. В 2010 г. из состава ЮФО был выделен Северо-Кавказский федеральный округ (СКФО), в который вошли Ставропольский край, Карачаево-Черкесская, Кабардино-Балкарская, Ингушская, Чеченская Республики и Республики Ингушетия, Дагестан и Северная Осетия-Алания. Природные очаги туляремии занимают более 65 % территории СКФО. Эти очаги имеют полигостальный и поливекторный характер и характеризуются чередованием волн эпизоотической и эпидемиологической активностей каждые 8-10 лет. На долю Сибирского федерального округа приходится 10,2 % заболевших, удельный вес заболеваемости туляремией в Северо-Западном федеральном округе составил 6,5 %, в Дальневосточном – 0,3 % от заболеваемости туляремией в РФ.

Согласно информации Федерального центра гигиены и эпидемиологии, в 2015 г. в РФ заболели туляремией 67 человек (показатель на 100000 населения – 0,05), а в 2016 г. – 123 (показатель на 100000 – 0,08) [153].

В 2017 г. на территории Российской Федерации зарегистрировано 168 случаев заболевания людей туляремией в 22 субъектах. Высокая спорадическая заболеваемость и групповые случаи наблюдались в Ставропольском крае (49), Республике Карелия (40), Омской области (20) и в Санкт-Петербурге (12). На территории Северо-Западного Федерального округа (СЗФО) в последнее время наблюдается наиболее высокий уровень заболеваемости туляремией в стране. В 2017 г. зарегистрировано 59 больных туляремией (55 – в аналогичный период 2016 г.) (Рисунок 12) [89].



Рисунок 12 – Заболеваемость туляремией в Европейской части России в 2017 г. [89]

Территория Ставропольского края (СК) считается эндемичной по туляремии с 1938 г., когда впервые были выделены культуры туляремийного микроба от грызунов и выявлены два больных человека [46, 54, 55, 75]. На территории СК существует обширный, стойкий природный очаг туляремии степного типа с осенне-зимней сезонностью проявлений, охватывающий 18 сельских районов из 26 [45, 46].

Основными носителями и источниками инфекции являются полусинантропные грызуны, а также зайцы, обуславливающие промысловый тип очага [20, 48]. В начале 2017 г. произошло значительное ухудшение эпидемиологической обстановки. За январь-март зарегистрированы 39 больных туляремией с заражением в 8 энзоотичных районах и реализацией различных путей передачи. У 22 больных (56 % от всех случаев) был реализован контактный путь, из них у 17 (43,5 %) – при контакте с тушками зайцев, у 5 (12,8 %) – при контакте с грызунами и их выделениями; у 12 (30,7 %) установлен алиментарный путь заражения, из них у 9 (23 %) – при употреблении питьевой водопроводной воды из родниковых каптажей, у 3 (7,6 %) – при употреблении инфицированных пищевых продуктов; у 5 (12,8 %) – реализован аспирационный путь. В

эпидпроцесс преимущественно вовлекалось взрослое население (79,4 %). Интерес представляет водный путь передачи туляремии через централизованное водоснабжение населения из родниковых каптажей в двух поселениях. Роль водного фактора была подтверждена молекулярно-генетическим методом с обнаружением в 35 (53 %) пробах из 65 исследованных ДНК *F. tularensis*, при постановке биопроб на белых мышах в 15 пробах воды выделена культура возбудителя [62]. Таким образом, эпидемиологические осложнения по туляремии в зимний период 2017 г. в активных энзоотичных районах края произошли на фоне прошедшей в осенний период 2016 г. разлитой эпизоотии с вовлечением промысловых животных – зайцев, с реализацией множественных путей передачи инфекции, характерных для очага степного типа [86]. Всего в регионе с конца 2016 г. зарегистрировано 49 больных туляремией. Значительную долю заболевших (22 человека) в СК составили охотники и члены их семей. Две локальные групповые вспышки (13 человек) связаны с водным путем передачи возбудителя туляремии через родниковую воду, используемую для водоснабжения сельских населенных пунктов Донская Балка и Константиновское в энзоотичном Петровском районе СК [62, 89].

Из анализа полученных данных следует, что в 2017 г. эпизоотические проявления туляремии различной степени интенсивности выявлены в 61 субъекте России, выделено 33 культуры возбудителя туляремии (22 – в Ставропольском крае, 6 – в Республике Алтай, 2 – в Республике Коми и по одной – в Орловской, Сахалинской областях и г. Москва). На основании анализа представленных данных в 2018 г. и далее эпизоотическая активность сохранится в природных очагах туляремии и возможно возникновение спорадических случаев заболевания среди вакцинированного населения на территориях: Центрального федерального округа (Воронежская, Калужская, Московская, Рязанская, Ярославская области и г. Москва); Северо-Западного федерального округа (Архангельская, Ленинградская области, Республики Карелия, Коми и

Санкт-Петербург); Южного федерального округа (Волгоградская, Ростовская области, Крым); Северо-Кавказского федерального округа (Ставропольский край); Приволжского федерального округа (Кировская, Саратовская области, Республики Мордовия и Удмуртия); Сибирского федерального округа (Омская, Томская и Кемеровская области, Хакасия, Тыва); Дальневосточного федерального округа (Хабаровский край, Сахалинская и Еврейская автономные области [89]).

Реализация эпидемического риска на конкретной территории зависит от инвестиций в инфраструктуру водоснабжения, санитарии и гигиены, эпизоотологического мониторинга природных очагов, а также от доверия у населения к туляремийной вакцине и спроса на иммунизацию [89].

Кроме всего вышесказанного, считаем необходимым отметить, что туляремийный микроб в Рейтинговой системе распределения биоагентов по вероятности использования как биоагента биологического оружия отнесен к первой группе (всего – три) и стоит на шестом месте (из 11), имея в Рейтинге 20 баллов (на первом месте – оспа, имеющая 26 баллов) [40].

1.5. Заключение по обзору литературы

Лабораторная диагностика туляремии имеет важнейшее значение в комплексе противоэпидемических мероприятий и складывается из индикации и идентификации возбудителя или его специфических антигенов и определения сывороточных антител у человека и восприимчивых животных. При этом, как правило, на практике предпочтение отдается серологическим и молекулярно-генетическим методам, характеризующимся высокой специфичностью, чувствительностью, адаптированным для прямого исследования самых разнообразных объектов биотической и абиотической природы. При их 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.

Применяемые регламентированные методы выявления возбудителя туляремии и других особо опасных инфекций не всегда достаточно эффективно обеспечивают их детекцию, даже при проведении предварительного концентрирования проб путем фильтрации или центрифугирования.

Одним из приоритетных направлений в лабораторной диагностике инфекционных болезней является разработка высокоэффективных способов концентрирования патогенов в исследуемом материале с последующей детекцией их антигенов, либо их селективной сепарацией для бактериологических исследований. Применение иммуномагнитной сепарации дает большие преимущества по сравнению с традиционными методами концентрирования при индикации микроорганизмов непосредственно в исследуемом материале. Основа методологии заключается в использовании магнитных частиц с иммобилизованными на их поверхности антителами, что обуславливает возможность эффективного распознавания возбудителей и их выделение из сложных биологических образцов.

Очевидно, что данная методология может быть эффективна при исследовании объектов окружающей среды на поиск возбудителя туляремии.

В целом анализ научной литературы, посвященной сорбционным материалам, свидетельствует о значительном интересе и широких возможностях их применения в различных сферах деятельности. Это позволяет исследователям сделать целенаправленный выбор того или иного сорбента для решения конкретной задачи. В медицинской практике успешно применяют различные сорбенты природного и химического происхождения. Как нам представляется, из всего многообразия сорбционных материалов для лабораторной диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний перспективными являются кремнеземные сорбенты, наиболее отвечающие всем требованиям для этих целей. Для

диагностических тест-систем наиболее важными критериями являются специфичность, чувствительность и воспроизводимость результатов, что диктует необходимость разработки стандартных условия как производства диагностикума, так и методов постановки лабораторного теста, чему и посвящены наши дальнейшие исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 2. Разработка стандартных условий биотехнологии производства и системы контроля качества магноиммуносорбента

Широкое применение медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), направленных на профилактику, лечение и диагностику инфекционных заболеваний, определяет повышенные требования к их эффективности и безопасности [154].

Расширение номенклатуры и разработка новых коммерческих МИБП повышает требования к уровню их производства, прежде всего, с учетом современных правил валидации и стандартизации.

Многочисленные успешные лабораторные испытания, апробация в очагах и на вспышках ряда инфекционных заболеваний свидетельствуют о надежности и перспективности использования диагностических магноиммуносорбентных тест-систем в эпиднадзоре за различными инфекционными заболеваниями [71, 165, 166].

Использование аттестованного стандартного образца МС в производстве МИБП позволит не только стандартизировать выпускаемые серии препаратов, но и значительно сократить затраты рабочего времени и тем самым снизить трудоемкость выполняемых работ.

Цель работы – разработка стандартного образца ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора композиционного органокремнеземного микрогранулированного магносорбента.

В ходе выполнения работы планировали:

- определить основные контрольные и критические точки производства МС, изготовить экспериментальные серии МС;
- изучить параметры МС, характеризующие форму и локальные свойства поверхности МС, размер микрочастиц, адсорбционную активность в отношении белков (IgG), магнитные свойства для определения алгоритма показателей СО МС;

- составить нормативную документацию на СО магносорбента (Программу разработки стандартного образца предприятия, инструкцию по применению и свидетельство на СО);
- провести межлабораторные испытания стандартного образца магносорбента на соответствие аттестационным значениям СО ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

2.1. Оптимальная последовательность процессов, параметров биотехнологии производства МИС и характеристика конечного продукта

Построение технологической схемы производства СО МС основано на стадиях конструирования органокремнеземного микрогранулированного магносорбента на основе алюмосиликата, модифицирование поверхности которого осуществлено в присутствии декстрана и вторичного алкилсульфата натрия [10, 70].

Сорбционным материалом служил кремнезем – алюминий кремнекислый мета. Алюмосиликат является мелкодисперсным порошком белого цвета, представляющим 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 использовали оксид железа (II). Это сложное мелкокристаллическое соединение двухвалентного железа и кислорода, черного цвета, с выраженными магнитными свойствами, не растворимое в воде. Оксиды железа нейтральны при связывании с биологически активными компонентами или клеточными структурами и не влияют на их свойства [217]. Это позволяет высокоэффективно использовать их для выделения белков, пептидов, поликлональных антител (Ат) при проведении клеточной сепарации [194, 216].

Модифицирование поверхности сорбента осуществляли в присутствии декстрана. В работе использовали 6 % коллоидный раствор

декстрана (полиглюкина) с молекулярной массой 60000 ± 10000 в 0,9 % растворе натрия хлорида.

Для оптимизации структурных характеристик МС проведены исследования по варьированию соотношения компонентов синтеза, а также изучено влияние времени гелеобразования и рН среды на величину удельной поверхности сорбентов, объем и размер пор.

Процесс получения МС осуществляли следующим образом: к 1 г алюмосиликата добавляли 30 мл 6 % водного раствора полиглюкина и оксид железа (II) от 1 до 5 г, перемешивали и проводили гелеобразование при температуре (22 ± 4) °С от 1 до 5 ч. Значение рН реакционной среды гелеобразования составляло 4,0-7,0. Полученный сорбент высушивали при 100-110 °С в течение 30 мин до полного испарения влаги.

Процесс гелеобразования завершался в течение двух часов. Дальнейшее увеличение времени также не приводило к существенному изменению структурных характеристик МС.

При увеличении продолжительности времени гелеобразования при синтезе МС происходило увеличение значений удельной поверхности и уменьшение размера пор.

Проведенная количественная оценка магнитных свойств полученных МС по методу А.В. Киселева и Т.Л. Кустова [125] свидетельствовала, что величина удельной намагниченности насыщения возрастала с увеличением содержания магнитного материала в его составе.

Изучение структурных характеристик МС показали, что удельная поверхность имела значение $64,5 \pm 0,74$ м²/г, объем пор – $1,21 \pm 0,005$ см³/г, радиус пор – $25,6 \pm 0,49$ нм.

На основе полученных результатов рекомендованы следующие оптимальные условия синтеза алюмосиликатного МС:

- соотношение компонентов – алюмосиликат: FeO (1:2, соответственно);
- время гелеобразования – 2 ч;

– рН гелеобразования – 7,0.

Магносорбенты были изучены на автоматическом счетчике частиц TC10™ («Bio-Rad», США) с применением одноразовых слайдов с камерами для суспензии частиц размером от 4 до 50 мкм в диаметре.

Изображение частиц просматривали на экране. Результаты подсчетов экспортировали на внешний USB – носитель (флеш-карту) и просматривали в программе Microsoft Excel на компьютере.

Исследования показали, что магнитные микрочастицы равномерно рассеяны в поле зрения без признаков конгломерации (Рисунок 13).

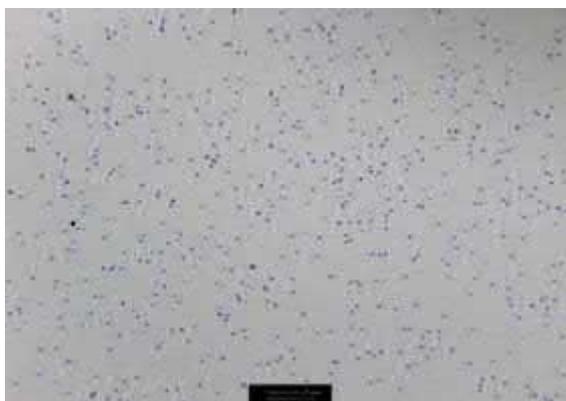


Рисунок 13 – Микрочастицы магносорбента МС при просмотре в автоматическом счетчике частиц TC 10™ («Bio-Rad», США)

Изучение распределения микрочастиц по их размерам также проводили на автоматическом счетчике частиц TC 10™. Анализ гистограммы показал, что они расположены в диапазоне 4-10 мкм (Рисунок 14).

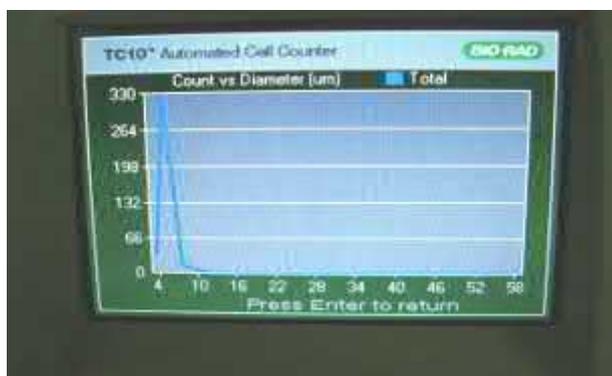


Рисунок 14 – Гистограмма магносорбента

Электронномикроскопическое исследование микроструктуры поверхности алюмосиликатного магносорбента показало сочетание участков сплошной непористой массы со структурой губчатого характера. По данным электронной микроскопии, алюмосиликатный сорбент в своей структуре объединяет элементы, характерные для макропористого стекла и гидротермального силохрома С-120. Магнитный порошок, входящий в состав композиционного сорбента, усиливает срастание глобулярных частиц в сплошные непористые участки за счет участия силанольных групп поверхности = Si-OH в дегидратационных процессах (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Микроструктура алюмосиликатного магносорбента.
(Увеличение $\times 10000$) (IMZ-T 3000, Япония).

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 16). Дендритная форма (Рисунок 16а) образовывалась вследствие скопления нескольких частиц.

*a**б*

Рисунок 16 – Микроскопия магносорбента: *a* – общий вид, *б* – отдельная частица (Увеличение×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 др. микросферических сорбентов предоставлено не было.

Многие свойства высокодисперсных порошков (например, механические, магнитные) определяются не только химическим составом и структурой материалов, но также размерами и формой исходных частиц. Известно, что размер частиц определяет величину удельной поверхности МС, а плотность их упаковки – объем и радиус пор. Микроструктура особенностей поверхности в решающей степени определяет адсорбционные свойства материалов. На размеры, форму частиц, особенности поверхности в первую очередь влияют способы получения МС.

Для получения частиц контролируемого размера измельчение МС проводили в шаровой планетарной мельнице Fritsch P-7 (Германия) методом сухого размолла (Рисунок 17).



Рисунок 17 – Шаровая планетарная мельница Fritsch P-7 (Германия)

Выбор размольных стаканов и шаров зависит от количества пробы, конечной тонкости и однородности фракций, необходимых для последующих исследований. Уровень заполнения стакана также имеет решающее значение для успешного измельчения в шаровой мельнице. Объем, занимаемый шарами, должен быть равен объему измельчаемого материала и не превышать $1/3$ общего объема размольного стакана. Оставшаяся треть стакана необходима для свободного движения шаров при измельчении.

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 циркониевые шары диаметром 5 и 10 мм в количестве от 5 до 15 штук. Количество загружаемого МС варьировало от 1 до 10 г. Скорость вращения планетарного диска при измельчении оксидов металлов была постоянной и составляла 450 об/мин.

Экспериментальные пробные помолы показали, что с увеличением числа шаров с минимальным диаметром резко сокращалось время размола с образованием высокой дисперсности частиц МС. Кроме того, увеличение массы мелющих тел приводило к лишним динамическим нагрузкам деталей планетарной мельницы, что способствовало их ускоренному износу. По мере увеличения степени заполнения размольного стакана материалом наблюдалось снижение эффективности процесса помола, выражающееся в неоднородности фракций. Максимальная эффективность процесса размола достигалась при использовании циркониевых шаров диаметром 10 мм в количестве 10 шт. и массой загружаемого МС – 3 г.

В результате 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.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение влияния времени измельчения на эффективность процесса помола. Измельчение образцов МС проводили в течение 1, 2, 3, 4, и 5 мин при указанном выше соотношении массы измельчаемого материала и количества шаров. Распределения частиц по размерам получены с помощью биологического микроскопа «Meiji Techno MT6000» (Япония) и представлены на рисунке 18.

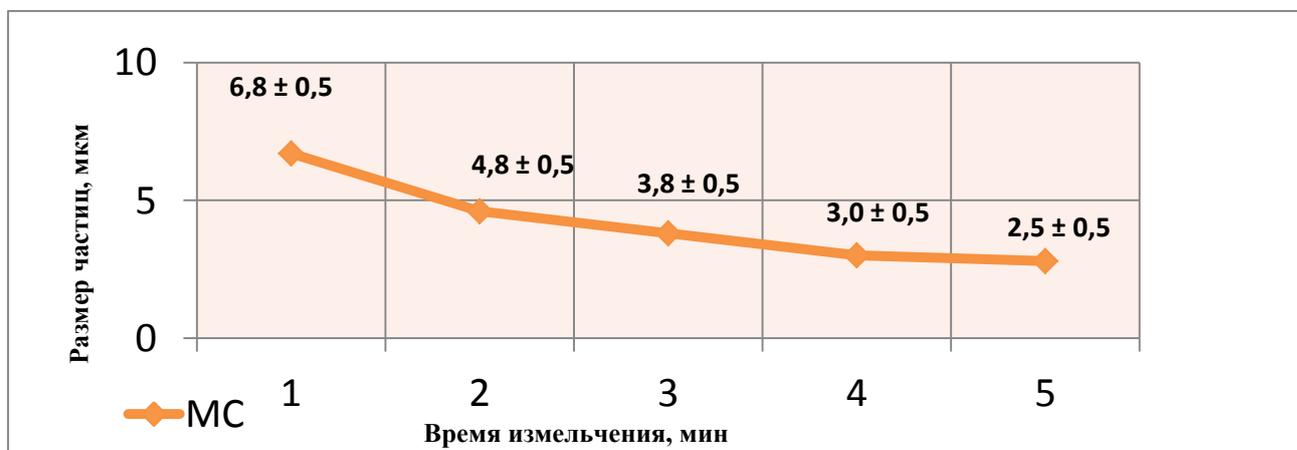


Рисунок 18 – Распределение частиц по размерам, полученное при измельчении магносорбента в течение 1-5 мин

Размер частиц МС после 1 мин обработки составил $6,8 \pm 0,5$ мкм и снижался с увеличением времени измельчения. Через две минуты измельчения данный показатель снизился до $4,8 \pm 0,5$ мкм, а через три минуты 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 мин 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 (сканирующий зондовый микроскоп SPM-9600, («Shimadzu», Япония) в исследовании МС позволило установить истинную форму и размеры частиц (Рисунок 19).

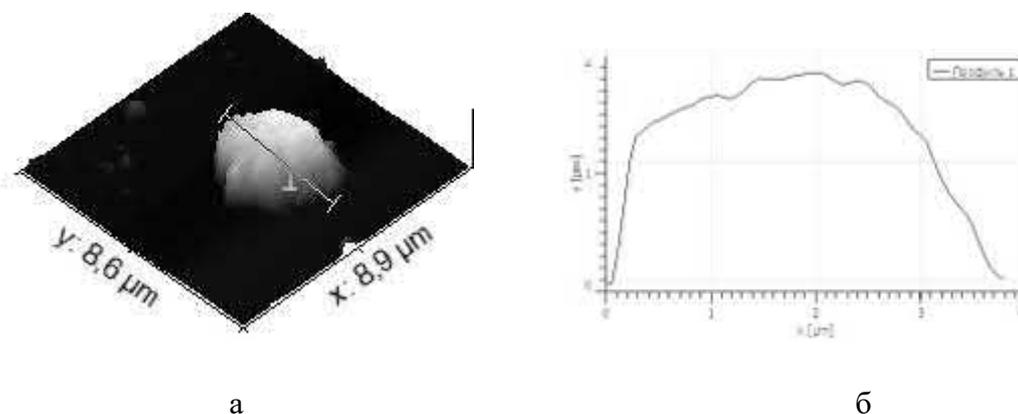


Рисунок 19 – АСМ-изображения частицы, полученной после трехминутного измельчения: а – топография частицы, б – профиль частицы
Примечание* плоскость сечения на рисунке 19 (а)

По внешнему виду и размерам все образцы МС были однородны и соответствовали предъявляемым требованиям.

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

Химическое активирование поверхности полученных после измельчения образцов МС проводили двумя равнозначными вариантами модифицирования твердофазных носителей: окисление перйодатом натрия и воздействие вторичным алкилсульфатом натрия.

К образцам МС добавляли расчетное количество фосфатно-солевого буфера (ФСБ), натрия периодата или вторичного алкилсульфата натрия, тщательно перемешивали до полного смачивания магносорбента. Инкубировали в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (30 ± 10) мин. По завершении времени инкубации суспензию магносорбента отстаивали, надосадочную жидкость удаляли, многократно промывали раствором ФСБ.

В результате окислительных процессов под действием натрия периодата на поверхности МС образуются альдегидные группы, способные взаимодействовать с аминокруппами белкового лиганда.

Вторичный алкилсульфат натрия, растворяясь в воде, образует мицеллы, которые благодаря гидрофобности, связывают мономерные формы поверхностных белков. При этом образуются структуры, напоминающие пчелиные соты.

После активирования поверхности к МС добавляли туляремийные иммуноглобулины с концентрацией $(2,5 \pm 0,5)$ мг/мл. Взвесь инкубировали в течение 2 ч при температуре 20-25 °С, периодически перемешивая, отстаивали, надосады фильтровали. Проводили измерение концентрации белка и рассчитывали его количество, иммобилизованного на поверхности МС. На всех этапах отделение магносорбента из жидкости проводили методом седиментации в поле постоянного магнита. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Эффективность иммобилизации IgG на поверхности магносорбентов

Время измельчения магносорбента, мин	Количество связавшихся IgG, мг/мл	
	магносорбент, активированный ПАВ	магносорбент, активированный периодатом натрия
1	$0,84 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,1$
2	$0,70 \pm 0,2$	$0,91 \pm 0,1$
3	$0,90 \pm 0,2$	$1,00 \pm 0,2$

Продолжение таблицы 3

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 оказывают существенное влияние на адсорбционную емкость МС. Наибольшее количество связавшихся IgG наблюдалось в образцах, активированных перйодатом натрия и измельченных в течение 3 мин, и составляло $(1,0 \pm 0,2)$ мг/мл. Трехминутный временной интервал измельчения способствовал адсорбции $(0,9 \pm 0,2)$ 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, измельченные 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.

Таким образом, очевидно, что наилучшими адсорбционными свойствами обладали образцы МС, измельченные в течение 3 мин с размером частиц $(3,8 \pm 0,5)$ мкм.

Используя полученные данные, в технологической схеме производства СО МС можно выделить следующие основные стадии: гидратация компонентов; термообработка гидрогеля; 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.

2.2. Разработка системы контроля качества МИС

Установление последовательности технологических операций с оптимальными условиями производства СО МС позволили выделить процессы, в которых необходимо проводить контрольные измерения, то есть установить контрольные точки (КТ). Для технологической 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.

Алгоритм производственных процессов получения СО МС представлена на рисунке 20.

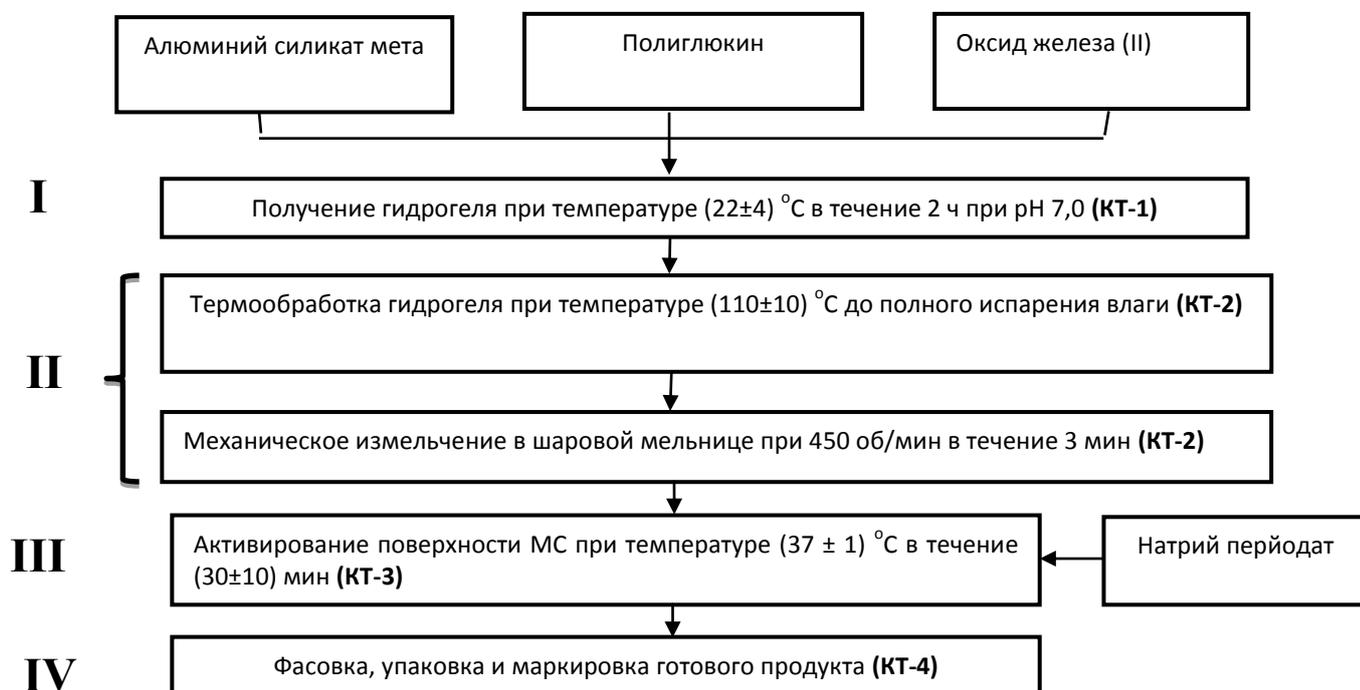


Рисунок 20 – Алгоритм получения стандартного образца магносорбента

Примечание* I – IV – стадии производства; КТ-1 – КТ-4 – контрольные точки производства

Гидратация компонентов: взвешивают 3,0 г алюминия метасиликата и 6,0 г оксида железа (II). Компоненты помещают в огнеупорную емкость, добавляют 60 мл 6 % водного раствора полиглюкина и 60 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают. Гелеобразование проводят при температуре (22 ± 4) °С в течение 2 ч (КТ-1).

Термообработка гидрогеля: образовавшийся гидрогель подвергают термообработке, высушивая его в сушильном вакуумном шкафу при температуре (110 ± 10) °С, до полного испарения влаги. После высушивания массу охлаждают и извлекают из емкости (КТ-2).

Механическое измельчение МС проводят методом сухого размола с использованием планетарной микромельницы. Охлажденную массу взвешивают по $(3,0\pm 0,5)$ г, помещают в размольные стаканы с мелющими циркониевыми шарами диаметром 10 мм. Гомогенизацию производят при 450 об/мин в течение 3 мин, полученные фракции объединяют (КТ-2).

Химическое активирование поверхности магносорбента: к МС добавляют расчетное количество ФСБ и натрия периодата, тщательно перемешивают до полного смачивания МС. На каждые 0,4 г МС добавляют 3,0 мл ФСБ и 0,1 г натрия периодата. Инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (30 ± 10) мин (КТ-3).

По завершении времени инкубации МС отстаивают в течение (5 ± 1) мин. Надосадочную жидкость удаляют, а МС многократно промывают раствором ФСБ до нулевой экстинкции на спектрофотометре. После отмывки в емкость добавляют ФСБ до конечной концентрации МС 100 мг/мл.

Фасовка, упаковка и маркировка готового продукта.

Суспензию МС с помощью дозатора при постоянном перемешивании фасуют в пенициллиновые флаконы ФО-1-10 по 0,5 мл и добавляют 3,5 мл раствора ФСБ. Флаконы герметично закрывают резиновыми пробками (ТУ 9398-001-31316292-2007) и завальцовывают алюминиевыми колпачками (ГОСТ Р 51314-99). Каждый флакон этикетировать и

упаковывают в картонные коробки соответствующего размера, в каждую коробку вкладывают инструкцию по применению (КТ-4).

По данной технологии было изготовлено 5 экспериментальных серий стандартного образца магносорбента.

Состав стандартного образца магносорбента в 1 флаконе: алюминий кремнекислый мета («ч» ТУ 6-09-01-356-76) – 0,15 г; оксид железа (II) («ч» ТУ 6-09-1404-76) – 0,3 г; фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) (рН (7,3±0,1) ФС 42-33874-99) – 4,0 мл.

Для модифицирования и активирования смеси алюминия метасиликата и оксида железа (II) использовали соответственно: декстран (полиглюкин 6 % раствор) (Р.ЛС-001462) – 60 мл; натрий перйодат («ч» ТУ 6-09-02-54-74) – 0,1 г

Качество полученных серий оценивали по следующим параметрам: внешний вид, рН, размер частиц, адсорбционная активность. Нормы аттестуемых характеристик должны соответствовать значениям, указанным в таблице 4.

Таблица 4 – Аттестуемые характеристики СО МС

Наименование характеристики	Нормы характеристики
Внешний вид	При перемешивании образуется гомогенная взвесь черного цвета, при отстаивании – бесцветная прозрачная надосадочная жидкость с черным осадком на дне флакона
рН	7,0 ± 0,2
Размер частиц	3,8 ± 0,5 мкм
Адсорбционная активность	1000 ± 200 мкг/мл

Контроль внешнего вида: определение проводили визуально при естественном освещении.

По внешнему виду СО МС представлял собой гомогенную суспензию черного цвета без признаков конгломерации. При отстаивании

образовывался черный осадок на дне флакона и бесцветная прозрачная надосадочная жидкость, легко взмучиваемая при встряхивании.

Контроль pH: определение проводили потенциметрически на pH-метре (PB-11 «Sartorius» (Германия)). Для контроля использовали содержимое трех флаконов от каждой серии.

Измерения показали, что pH находился в пределах 6,8-7,2 ед.

Контроль размера частиц: из трех флаконов пяти серий с помощью дозатора отбирали по 10 мкл суспензии магносорбента, ресуспендировали его в 10 мкл дистиллированной воды. Взвесь наносили на предметное стекло, высушивали и просматривали на биологическом микроскопе «Meiji Techno MT6000» (Япония) при увеличении $\times 40$, определяли размер отдельно расположенных частиц. Изображение частиц просматривали на экране. За результат контроля принимали среднее арифметическое значение результатов десяти измерений.

По данным микроскопии, СО МС – высокодисперсные частицы неправильной округло-овальной формы с выраженными магнитными свойствами. В своей структуре частицы содержат оксид железа (II), расположенный в объеме алюмосиликатной матрицы. Размер частиц варьировал от 3,3 до 4,3 мкм (Рисунок 21).

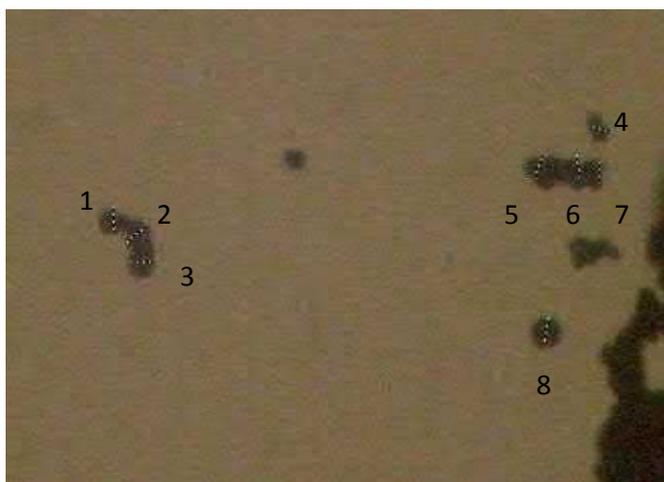


Рисунок 21 – Размер отдельных частиц, мкм («Meiji Techno MT6000», Япония)

Примечание* 1 – 4,0; 2 – 3,7; 3 – 3,8; 4 – 3,4; 5 – 4,3; 6 – 4,2; 7 – 4,0; 8 – 4,3. Увеличение $\times 40$.

Контроль адсорбционной активности МС изучали путем иммобилизации на его поверхности IgG с конечной концентрацией ($2,5\pm 0,5$) мг/мл, выделенных из гипериммунных кроличьих сывороток. Контроль проводили на примере туляреминых иммуноглобулинов.

Для контроля использовали по три флакона от каждой серии. Для этого из флаконов удаляли надсадочную жидкость, в каждый флакон добавляли 2 мл раствора IgG, инкубировали при температуре (22 ± 4) °С в течение ($2,0\pm 0,5$) ч, периодически перемешивая.

МС отстаивали в течение (15 ± 1) мин при температуре (22 ± 4) °С. Надсадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр и использовали для контроля адсорбционной активности. Эффективность процесса оценивали по степени извлечения IgG из водной суспензии магносорбента.

Изучение адсорбционной активности показало способность частиц МС связывать более 10 мг туляреминых IgG на 1,0 г сорбента, при соблюдении указанных условий иммобилизации.

При *контроле маркировки и упаковки* проверяли внешний вид препарата, правильность заполнения этикеток и качество внешней маркировки (Рисунки 22-24).



Рисунок 22 – Внутренняя и внешняя упаковка СО МС, флаконы с МС.

На внутренней маркировке должно быть указано: сокращенное название предприятия изготовителя, наименование препарата, объем в мл, номер серии, срок годности, условия хранения (Рисунок 23).

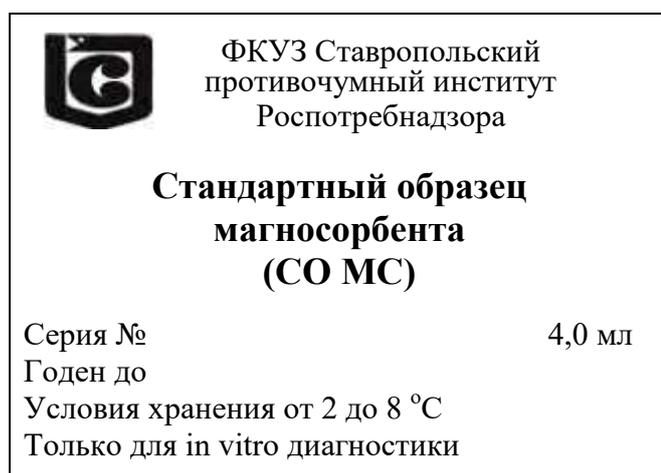


Рисунок 23 – Образец внутренней маркировки СО МС

На внешней маркировке должно быть указано: полное название предприятия-изготовителя, юридический адрес, адрес электронной почты, телефон (факс), товарный знак, полное и сокращенное название препарата, номер серии, регистрационный номер в реестре стандартных образцов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, символы: номер серии, дата изготовления, срок годности, температура хранения по ГОСТ Р 15223-1-2010 (Рисунок 24).

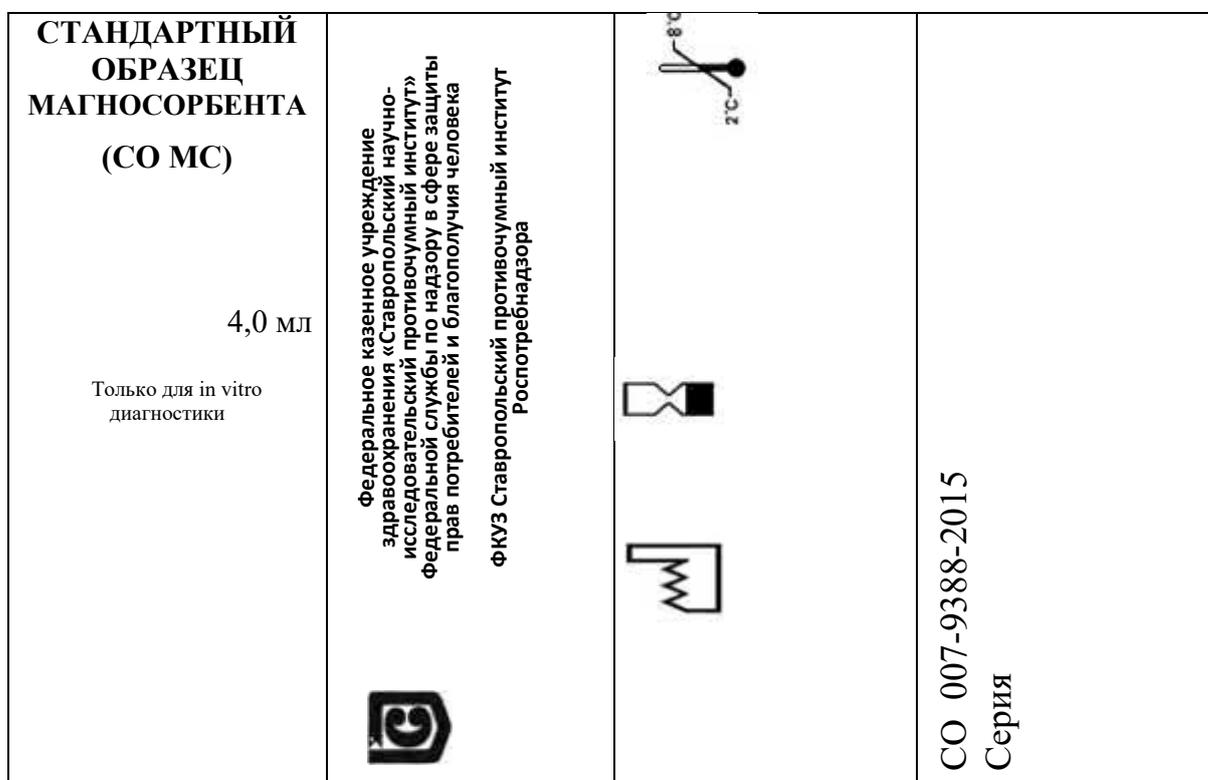


Рисунок 24 – Образец внешней маркировки СО МС

Определение стабильности основных показателей качества при хранении и срока годности является одним из требований, предъявляемых к

стандартным образцам МИБП (СП 3.3.2.1288-2003). Для определения стабильности препаратов используют так называемый классический метод или метод долговременной стабильности. Сущность его заключается в том, что испытуемые образцы хранят при комнатной температуре в течение периода, перекрывающего предполагаемый срок годности. Через определенные промежутки времени оценивают стабильность установленных параметров хранящегося образца. На основании окончательных результатов анализа делают заключение об оптимальном сроке хранения. Наиболее распространен метод ускоренного теста, позволяющий за несколько коротких интервалов исследования прогнозировать сроки годности готового препарата.

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 сут. Параллельно проводили исследование долговременной стабильности, выдерживая образцы при температурах $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ и $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ в течение 6, 12 и 18 мес.

Качество экспериментальных серий СО МС в различные сроки их хранения оценивали по аттестуемым показателям, представленным в таблице 5.

В исследованиях использовано по три флакона пяти экспериментальных серий СО МС: серия 1-13, дата изготовления 07.11.13 г.; серия 2-13, дата изготовления 08.11.13 г.; серия 3-13, дата изготовления 11.11.13 г.; серия 4-13, дата изготовления 12.11.13 г.; серия 5-13, дата изготовления 13.11.13 г. Результаты представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 5 – Критерии стабильности аттестуемых показателей пяти экспериментальных серий стандартного образца магносорбента (СО МС) при хранении в температурном режиме (5±3) °С и (22±4) °С (для контроля использовано по три флакона из каждой серии)

Срок хранения	Контролируемые показатели	Серии контролируемого препарата				
		1-13	2-13	3-13	4-13	5-13
На момент изготовления 14.11.13 г.	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует однородную взвесь черного цвета, при отстаивании – прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании				
	pH	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
	Размер частиц, мкм*	3,8 ± 0,5	3,8 ± 0,5	3,8 ± 0,5	3,8 ± 0,5	3,8 ± 0,5
	Адсорбционная активность, мкг/мл	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200
Через 6 мес хранения 14.05.14 г.	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует однородную взвесь черного цвета, при отстаивании – прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании				
	pH	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
	Адсорбционная активность, мкг/мл	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200
Через 12 мес хранения 14.11.14 г.	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует однородную взвесь черного цвета, при отстаивании – прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании				
	pH	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
	Адсорбционная активность, мкг/мл	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200
Через 18 мес хранения 14.05.15 г.	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует однородную взвесь черного цвета, при отстаивании – прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании				
	pH	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
	Адсорбционная активность, мкг/мл	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200

Примечание* Размер частиц контролируется только на момент изготовления

Таблица 6 – Критерии стабильности аттестуемых показателей пяти экспериментальных серий стандартного образца магносорбента (СО МС) при хранении в температурном режиме (58±1) °С (для контроля использовано по три флакона из каждой серии)

Срок хранения	Контролируемые показатели	Серии контролируемого препарата				
		1-13	2-13	3-13	4-13	5-13
Через 14 сут. хранения 27.11.13 г.	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует гомогенную взвесь черного цвета, при отстаивании – прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании				
	рН	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
	Адсорбционная активность, мкг/мл	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200
Через 21 сут. хранения 04.12.13 г.	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует гомогенную взвесь черного цвета, при отстаивании – светло-желтую прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании				
	рН	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
	Адсорбционная активность, мкг/мл	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200	1000 ± 200

Таблица 7 – Аттестованные показатели трех серий стандартного образца магносорбента в результате межлабораторных испытаний

Наименование показателя	Требования НД	Полученные результаты		
		Серия 1-15	Серия 2-15	Серия 3-15
Внешний вид	При перемешивании образуется гомогенная взвесь черного цвета, при отстаивании – бесцветная прозрачная надосадочная жидкость с черным осадком на дне флакона	При перемешивании во всех образцах трех серий образовывалась гомогенная взвесь черного цвета, при отстаивании – бесцветная прозрачная надосадочная жидкость с черным осадком на дне флакона		
рН	$7,0 \pm 0,2$	6,8	6,9	7,0
		6,9	7,0	7,0
		7,0	6,8	6,9
Размер частиц, мкм	$3,8 \pm 0,5$	4,1	3,8	3,8
		3,8	3,9	4,1
		3,9	3,7	3,8
Адсорбционная активность, мкг/мл	1000 ± 200	1000	1100	980
		980	1000	900
		1020	1000	990

Установлено, что образцы СО МС при температурах хранения (5 ± 3) °С и (22 ± 4) °С были стабильны без изменения внешнего вида, рН и адсорбционной активности в течение 6, 12 и 18 месяцев (срок наблюдения).

Более высокая температура хранения образцов (58 ± 1) °С в течение 14 и 21 сут. не влияла на показатели рН и адсорбционной активности. Однако наблюдалось изменение цветности надосадочной жидкости в образцах после 21 сут. хранения при указанной температуре, не оказывающее существенного влияния на основные аттестуемые характеристики испытываемых серий СО МС.

Таким образом, результаты проведенных исследований по сохранению стабильности аттестуемых характеристик в процессе хранения позволяют рекомендовать гарантийный срок хранения СО МС – 3 года.

2.3. Разработка нормативной документации на стандартный образец магносорбента

Заключительным этапом разработки технологии изготовления СО МС являлось составление и оформление комплекта нормативных документов, устанавливающих требования к производству и обеспечению качества готового продукта.

Пакет НД разработан с учетом требований к стандартным образцам действующих санитарных правил Минздрава России (СП 3.3.2.1288-2003) [106] и включает: программу разработки, инструкцию по применению и свидетельство на СО МС.

Программа разработки устанавливает порядок и технологические этапы производства СО МС и предусматривает:

- обоснование назначения с указанием предполагаемых аттестуемых характеристик стандартного образца и методов их определения;
- выполнение научно-исследовательских работ;
- изготовление СО МС с указанием последовательности этапов и оптимальных условий производства;
- выполнение научно-исследовательских работ;
- изготовление СО МС с указанием последовательности этапов и оптимальных условий производства;
- установление срока годности СО;
- разработку маркировки и упаковки СО.
- условия транспортировки и хранения.

В Инструкции по применению отражено назначение и состав СО, рекомендованный способ использования, форма выпуска, условия хранения и транспортирования.

В соответствии с приказом директора № 108 от 2 июня 2015 г., 09.06.2015 г. совместно с сотрудниками лаборатории биологического и технологического контроля ФКУЗ Ставропольский противочумный

институт Роспотребнадзора проведены межлабораторные комиссионные испытания СО МС. В испытаниях использовали СО МС трех экспериментально-производственных серий: 1-15 – 3 флакона, дата изготовления 26.05.2015 г.; 2-15 – 3 флакона, дата изготовления 27.05.2015 г.; 3-15 – 3 флакона, дата изготовления 28.05.2015 г. Результаты межлабораторных испытаний представлены в таблице 7.

Проведенные межлабораторные испытания показали, что все экспериментально-производственные серии СО МС соответствовали требованиям (аттестованным значениям СО) нормативной документации.

По результатам проведения аттестации составлено Свидетельство на СО МС, основными положениями которого являются: назначение и состав СО МС, метрологические характеристики, документы, определяющие порядок и условия применения, условия хранения и транспортирования, срок годности.

Нормативная документация одобрена Ученым советом и утверждена директором института (протокол № 5 от 18.06.2015 г.). Стандартный образец магносорбента зарегистрирован в реестре СО ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, регистрационный номер 007-9388-2015.

2.4. Заключение по Главе 2

С целью стандартизации магноиммуносорбентных диагностических препаратов и налаживания их производственного выпуска нами проведена разработка стандартных условий биотехнологии композиционного органокремнеземного микрогранулированного магносорбента.

В качестве сорбционного материала использовали алюминий кремнекислый мета (алюмосиликат), обладающий высокой реакционной способностью поверхностных групп при взаимодействии со многими соединениями. Магнитный компонент – оксид железа (II) с ярко

выраженными магнитными свойствами. Модифицирование поверхности сорбента осуществляли в присутствии полимера – декстрана и вторичного алкилсульфата натрия (ПАВ).

Проведенные исследования по варьированию соотношения компонентов синтеза, влиянию времени гелеобразования и pH среды позволили определить следующие оптимальные условия: соотношение алюмосиликат: FeO – 1:2; время гелеобразования – 2 ч; pH гелеобразования – 7,0; проведение термообработки при 100-110 °С в течение 30 мин.

Так как технология изготовления МС многостадийна и предусматривает механическое измельчение материала после стадии высушивания, важным фактором, влияющим на кинетику реакции сепарации, является конечный размер частиц. Для получения частиц контролируемого размера измельчение МС осуществляли методом сухого размольа, используя планетарную микромельницу Fritsch P-7 (Германия), размольные стаканы и мелющие шары из диоксида циркония. В результате проведенных экспериментов установлены 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.

Оптимальными адсорбционными свойствами обладали образцы МС, измельченные в течение 3 мин., с размерами частиц $3,8 \pm 0,5$ мкм, которые адсорбировали $1,0 \pm 0,2$ мг/мл IgG на 1 мл 10% взвеси МС.

Проведенные исследования послужили основанием для разработки стандартного образца магносорбента ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (рег. № 007-9388-2015) с установленными значениями физико-химических и биологических параметров, воспроизводимых от серии к серии. Установлено сохранение стабильности характеристик СО МС без изменения

внешнего вида и потери адсорбционной активности в течение всего срока наблюдения. Применение стандартного образца магносорбента в качестве магнитной матрицы позволяет оптимизировать технологический процесс производства, получая точные и сопоставимые результаты, значительно повышая биологические характеристики разрабатываемых новых и выпускаемых магноиммуносорбентных диагностических препаратов. Результаты проведенных исследований по стабильности аттестуемых характеристик в процессе хранения позволили рекомендовать гарантийный срок хранения СО МС – 3 года.

Глава 3. Применение магноиммуносорбентов в лабораторной диагностике особо опасных инфекций

Мониторинг инфекционных болезней является одной из наиболее важных составляющих комплекса мер по предотвращению эпидемий и борьбе с ними. При этом для успешного решения важнейших проблем биологической безопасности общества необходимо постоянно поддерживать высокий уровень передовых отечественных иммунобиологических технологий [113, 114].

3.1. Разработка производственной технологии туляреминого композиционного аффинного сорбента с магнитными свойствами и внедрение в практику магноиммуносорбентной тест-системы для иммуноферментного анализа возбудителя туляремии

3.1.1. Получение биологического сырья (специфических антигенов, туляреминой антисыворотки)

Из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора были получены следующие штаммы: *F. tularensis* 543/6 (*mediaasiatica*, среднеазиатский подвид); *F. tularensis* Schu (*nearctica*, неарктический подвид); *F. tularensis* Miura, *F. tularensis* 325/1765, *F. tularensis* 83 ery^s, *F. tularensis* 503/840 (*holarctica*, голарктический подвид) и вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЖТВ) для их сравнительного изучения и выбора для производственных целей. Антигенные вещества различной химической природы получали комплексным методом по способу, разработанному Н.Ф. Василенко с соавт. [121] (Рисунок 25).

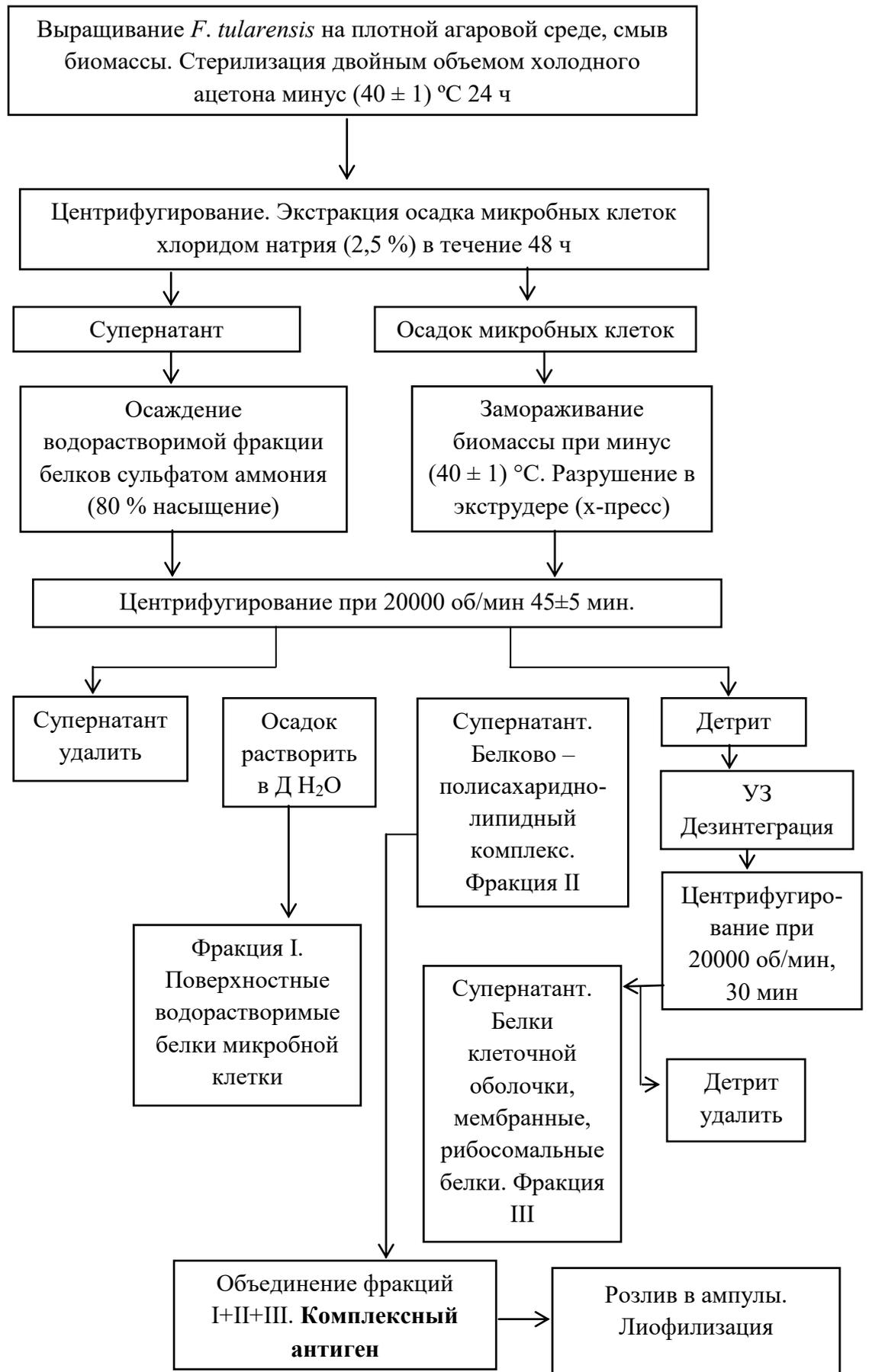


Рисунок 25 – Алгоритм манипуляций по получению водорастворимых антигенных комплексов *F. tularensis*

Экстракция осадка 2,5 % раствором NaCl и выделение второго супернатанта позволяли в максимальной степени извлекать антигены из бактериальной массы, а фракционирование сульфатом аммония, помимо концентрирования и очистки, приводило к стабилизации белков. В конечном итоге получен наиболее полный антигенный комплекс из микробов с сохранением нативности биополимеров.

При изучении методом диск-электрофореза в ПААГ белкового спектра Аг *F. tularensis* различных подвидов нами показано, что их протеинограммы различаются как по количеству белковых фракций, так и по степени их выраженности и электрофоретической подвижности: при разделении образуется от 6 до 10 белковых зон (Рисунок 26).

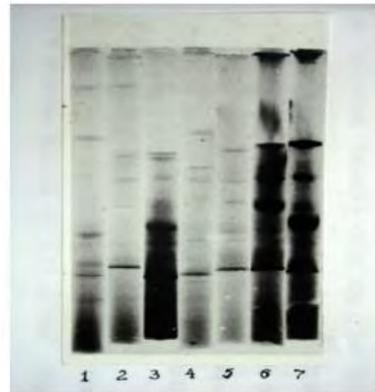


Рисунок 26 – Протеинограмма водорастворимых антигенов *F. tularensis*

Примечание* 1- *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЖТВ); 2-*F. tularensis* 83 ery^s; 3-*F. tularensis* 503/840; 4- *F. tularensis* 543/6; 5-*F. tularensis* Miura; 6-*F. tularensis* Schu; 7-*F. tularensis* 325/1765

При анализе протеинограмм туляремийных Аг, выделенных из штаммов голарктического подвида, было выявлено, что их белковый спектр состоял из 7-10 фракций с величинами Rf, лежащими в пределах 0,1-0,87. Протеинограмма неарктического подвида (*F. tularensis* Schu) характеризовалась наличием 9 белковых фракций с Rf в пределах 0,33-0,8. Протеинограмма штамма живой туляремийной вакцины состояла из 6 белковых фракций (Rf 0,11-0,76). Общими с голарктическими и неарктическим штаммами были фракции с Rf 0,11; 0,65; 0,69; 0,76. Белковый спектр авирулентного штамма *F. tularensis* 325/1765

голарктического подвида был представлен 9 белковыми фракциями с электрофоретической подвижностью в пределах Rf от 0,02 до 0,78. Штамм *F. tularensis* 325/1765 имел общую белковую фракцию Rf 0,65 со всеми исследованными штаммами. Кроме того, выявлен еще ряд общих белковых фракций с другими штаммами туляремиального микроба: Rf 0,33 – *F. tularensis* 83 ery^s, *F. tularensis* 503/840, *F. tularensis* Miura, *F. tularensis* Schu; Rf 0,51 и 0,78 *F. tularensis* Miura; Rf 0,69 – *F. tularensis* Schu и 15 НИИЭГ.

На основании проведенных исследований для дальнейшей работы нами выбраны 3 штамма *F. tularensis* разных подвигов: *F. tularensis* 543/6 (*mediaasiatica*), *F. tularensis* Schu (*nearctica*) и *F. tularensis* 503/840 (*holarctica*). Объединив стерильные бакмассы (этих штаммов) «ана», изолировали полигрупповой водорастворимый Аг по схеме, описанной ранее.

Иммунную туляремиальную сыворотку получали по разработанной И.С. Тюменцевой, Е.Н. Афанасьевым, В.И. Ефременко с соавт. [128] схеме иммунизации: водорастворимый антиген пятикратно вводили кроликам-продуцентам внутривенно, одновременно внутримышечно в качестве иммуномодулятора инъецировали тималин, в третью инъекцию дополнительно вводили внутримышечно циклофосфан (N¹-бис/β-хлорэтил)-N¹-О-триметиловый эфир диамида фосфорной кислоты) (Таблица 8).

Таблица 8 – Схема иммунизации кроликов с использованием тималина и циклофосфана

№ инъекции	Интервал между инъекциями, сутки	Количество вводимого антигена, мкг	Способ введения антигена	Иммуномодуляторы			
				Тималин		Циклофосфан	
				доза, мг	способ введения	доза, мг	способ введения
1	–	1000	в/в	5	в/м	–	–
2	3-4	1250	в/в	5	в/м	–	–
3	3-4	1500	в/в	5	в/м	100	в/м
4	3-4	1750	в/в	5	в/м	–	–
5	3-4	2000	в/в	5	в/м	–	–

Примечание* в/в – внутривенно; в/м – внутримышечно

Использование в качестве иммуномодулятора тималина способствовало значительному повышению титров специфических сывороточных Ат за счет увеличения числа антителобразующих клеток в результате стимуляции функции макрофагов и хелперных Т-клеток. Циклофосфан, являясь классическим иммуносупрессором, также активизировал макрофаги, стимулируя фагоцитарную, цитотоксическую и супрессивную (в отношении главным образом Т-лимфоцитов) функции [94]. Такая избирательность в действии иммуностимулятора, с одной стороны, и определенная селективность в действии иммуносупрессора, с другой, служили оптимальной комбинацией препаратов обеих групп и режимов их использования для активации одних механизмов иммунитета и выключения других. При данном способе продолжительность цикла иммунизации составляла 31-35 дней, расход антигенного материала – 7550 мкг на одного кролика. Титры специфических антител в сыворотках животных при определении в РИД достигали показателей $1:15,4 \pm 1,25$ – $1:28,8 \pm 2,5$, а в НРИФ – не ниже $1:13926,4 \pm 1372,16$.

При определении специфичности полученных гипериммунных туляремиальных сывороток на 14 гетерологичных штаммах микроорганизмов (*Y. enterocolitica* 64, *Y. enterocolitica* 178, *Y. enterocolitica* 383, *Y. enterocolitica* 124, *B. abortus* 19ВА, *B. abortus* 544, *B. abortus* 82, *B. suis* 61, *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16М, *B. melitensis* Rev-1, *E.coli* SA-11, *E.coli* 113-3, *S. typhimurium* 9640, *S. typhimurium* 7407) в НРИФ наблюдалось свечение на 2-3 креста у представителей рода *Brusella*.

Для удаления перекрестно реагирующих антител путем контакта с антигенами, которые обладают общими с индуцирующим антигеном детерминантами, проведена сорбция гипериммунных сывороток алюмосиликатным антигенным магноиммуносорбентом [11], белковым лигандом при этом служили водно-солевые экстракты из

гетерологичных штаммов микроорганизмов – *B. abortus* 19ВА, *B. melitensis* Rev-1, *B. suis* 61, взятые в равных количествах.

Иммуносорбцию проводили дважды, соединяя 10 мл иммунной сыворотки с 1 мг МИС. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 6 ч или при температуре 4 °С – 16 ч на шуттель-аппарате. При инкубации, используя постоянный магнит для фиксации МИС, сыворотку сливали.

При сорбции иммунных сывороток использование данного иммуносорбента позволило не только освободить их от неспецифических антител на одном этапе, но и сохранить первоначальную активность нативных сывороток.

Сыворотки разливали в ампулы ШПВ-6 по 2 мл, замораживали в низкотемпературном столе «Elcold» (Дания) при температуре минус (45±5 °С) не менее 18 ч, после чего перегружали в сушку лиофильную камерного типа ЛС-500 и сублимировали.

Таким образом, нами получена гипериммунная кроличья туляремийная адсорбированная сухая высокоспецифичная сыворотка, которая отвечает критериям оценки ее как сырья для дальнейшего конструирования диагностических препаратов.

3.1.2. Получение диагностических иммуноглобулинов для иммуноферментного анализа

Применение ИФА как метода для оценки свойств при конструировании МИС предполагало изготовление конъюгатов, для чего также в качестве лиганда использовали IgG, выделенные с помощью ПЭГ-6000 из туляремийной гипериммунной адсорбированной сыворотки.

Ферментом служила пероксидаза хрена (ПХ) Олайнского завода химреактивов марки А, тип YI, Rz 3,0 с активностью 500 ЕД, предварительно окисленная до альдегидной группы перйодатом натрия по методу Р. К. Nakane, А. Kawaoi [207] в модификации М.В. Wilson, Р. К. Nakane [233]. При этом навеску ПХ (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 мин. К растворенной ПХ добавляли 0,04 М раствор перйодата натрия из расчета 1 мл на 5 мг пероксидазы, инкубировали при легком помешивании в темноте в течение 20 мин. Затем к 5 мг ПХ приливали 1,0 мл раствора этиленгликоля в концентрации 0,16 М и после инкубации в темноте при легком помешивании в течение 1 ч раствор диализовали против 0,01 М карбонат-бикарбонатного буфера (КББ) рН 9,5 в течение 18-20 ч при температуре 4 °С с двукратной сменой буфера.

К активированной ПХ добавляли 1 мл раствора IgG с содержанием белка 5 мг/мл и инкубировали 2 ч при слабом помешивании в темноте, после чего в смесь вносили 5 мг натрия боргидрида, оставляли без перемешивания в течение 2 ч при температуре 4 °С на магнитной мешалке.

Для обеспечения стабильности физических и иммунохимических показателей иммунопероксидазного конъюгата (КПХ) нами предложен способ его консервации путем добавления раствора белкового стабилизатора (БС) (патент РФ на изобретение № 2549971 (2015)).

БС готовили следующим образом: к 25 мл белка куриного яйца добавляли 75 мл дистиллированной воды и 1,25 г натрия двууглекислого, перемешивали в течение 10-15 мин на магнитной мешалке. Затем прогревали при температуре 56 °С 40-60 мин, фильтровали через 8 слоев марли. Раствор БС на основе водной эмульсии куриного белка в 0,1 М растворе фосфатно-солевого буфера (1:1,5) в объемном соотношении 1:1 разливали в ампулы по 0,1 мл, замораживали и лиофилизировали. В результате проведенных экспериментов было получено 5 серий КПХ. Рабочий титр, специфическую активность, специфичность иммунопероксидазных конъюгатов определяли по методике М. Clark, А. Adams в «сэндвич»-варианте ИФА [182], используя микропланшеты для иммунологических

реакций. Результаты реакций учитывали визуально и на регистрирующем фотометре «Multiskan FC» (Termoscientific, Финляндия) при длине волн 450 нм путем определения оптической плотности (ОП) проб, находящихся в лунках планшета. Результаты считали положительными, если ОП исследуемого образца в два и более раз превосходили среднее значение ОП отрицательных контролей.

Рабочий титр изготовленных серий иммуноглобулиновых туляреминых КПХ составил 1:400 – 1:800. Чувствительность конъюгатов по водорастворимому антигену – 50-100 нг/мл.

Кроме того, для оценки чувствительности и специфичности КПХ в качестве тест-объектов использовали корпускулярные антигены гомологичных и гетерологичных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 144/713, *F. tularensis* 122, *F. tularensis* 319/38; *Y. enterocolitica* 64, *Y. enterocolitica* 178, *Y. enterocolitica* 383, *Y. enterocolitica* 124; *E.coli* 113-3, *E.coli* SA-11; *S. typhimurium* 9640, *S. typhimurium* 7407; *B. abortus* 19ВА, *B. abortus* 272, *B. suis* 61, *B. suis* 461, *B. melitensis* Rev-1, *B. melitensis* 14, *B. melitensis* 93.

Приготовленные микробные взвеси кипятили 20 мин с последующим добавлением фенола до 1 % концентрации и экспозиции в течение 24 ч при температуре (22±4) °С. Из всех обеззараженных культур готовили микробные взвеси в 0,9 % растворе натрия хлорида, соответствующие 10 единицам стандартного образца мутности (ОСО). Далее делали разведения с использованием ФСБ с шагом 10, получая концентрации от 1×10^7 до 1×10^2 м. к./мл.

За рабочее разведение КПХ принимали такое максимальное разведение последнего, при котором в ИФА выявлялось минимальное количество клеток возбудителя при отсутствии окрашивания контроля. Чувствительность КПХ для ИФА по корпускулярным антигенам составила 1×10^4 – 1×10^5 м. к./мл. Все серии полученных конъюгатов для ИФА дали отрицательные результаты с гетерологичными штаммами,

что свидетельствовало об их специфичности. Таблица 9 отражает результаты изучения физико-химических свойств и чувствительности конъюгатов.

Таблица 9 – Характеристика иммунопероксидазного туляремийного иммуноглобулинового конъюгата

Критерии оценки	Серии				
	1	2	3	4	5
Внешний вид	аморфная пористая масса белого цвета				
Растворимость	в 1 мл дистиллированной воды в течение 1 мин				
Прозрачность	раствор прозрачен				
Цветность раствора	бесцветная жидкость				
pH	7,6	7,5	8,3	8,1	8,2
Потеря в массе при высушивании, %	2,0	2,6	2,2	2,0	2,1
Rz	0,5	0,5	0,41	0,43	0,47
Рабочий титр	1:800	1:400	1:800	1:800	1:800
Чувствительность, м.к./мл	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5

В соответствии с руководящими документами на оформление нормативной документации [115, 142], технология изготовления «Набора реагентов тест-системы диагностической для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА)» («ИФА-Тул-СтавНИПЧИ») представлена на рисунках 27-32.

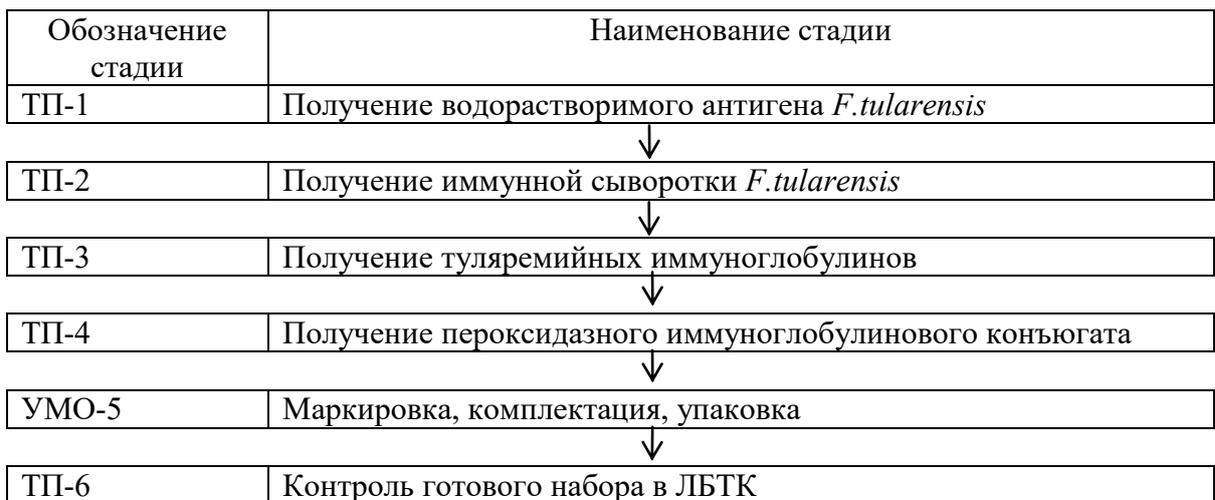
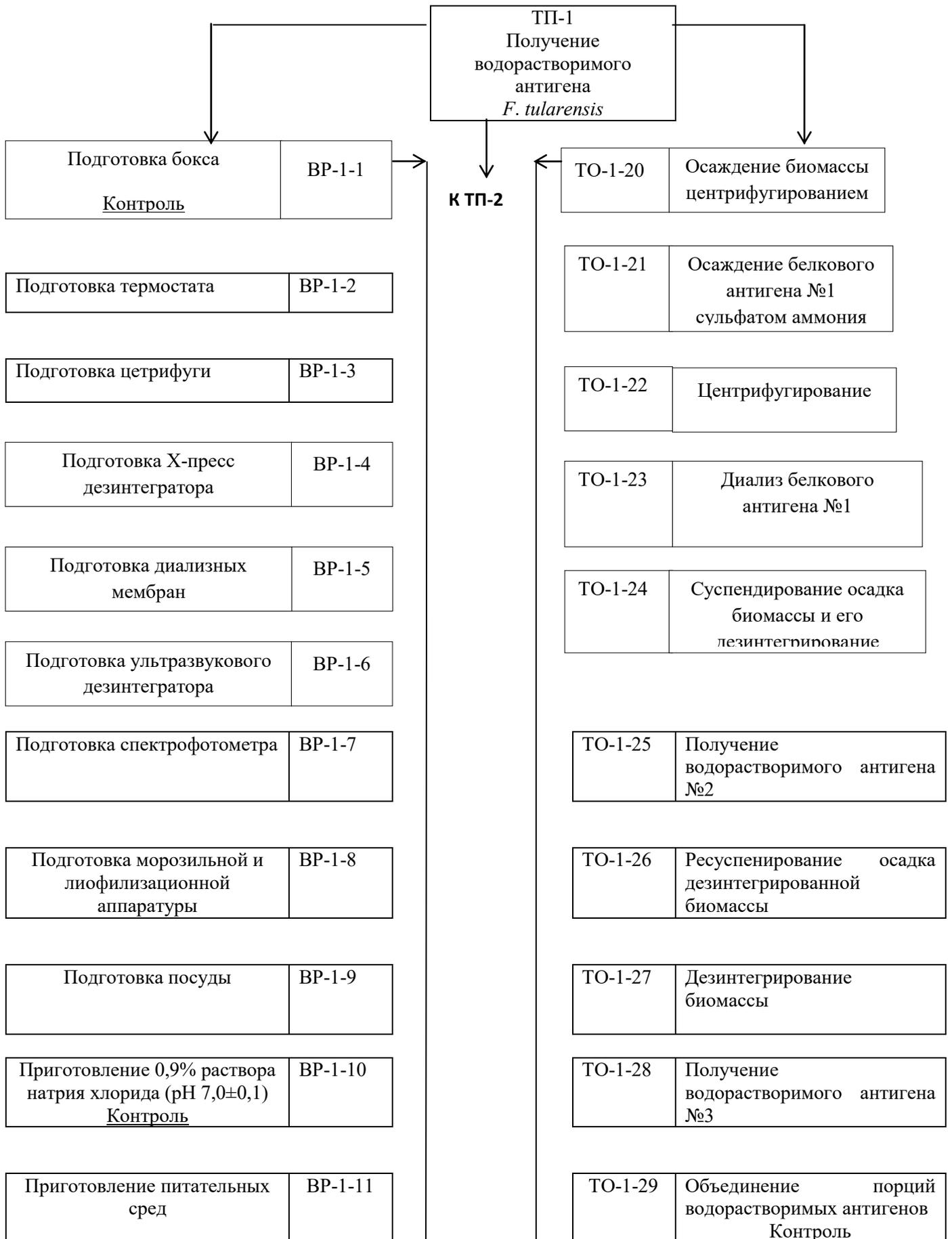
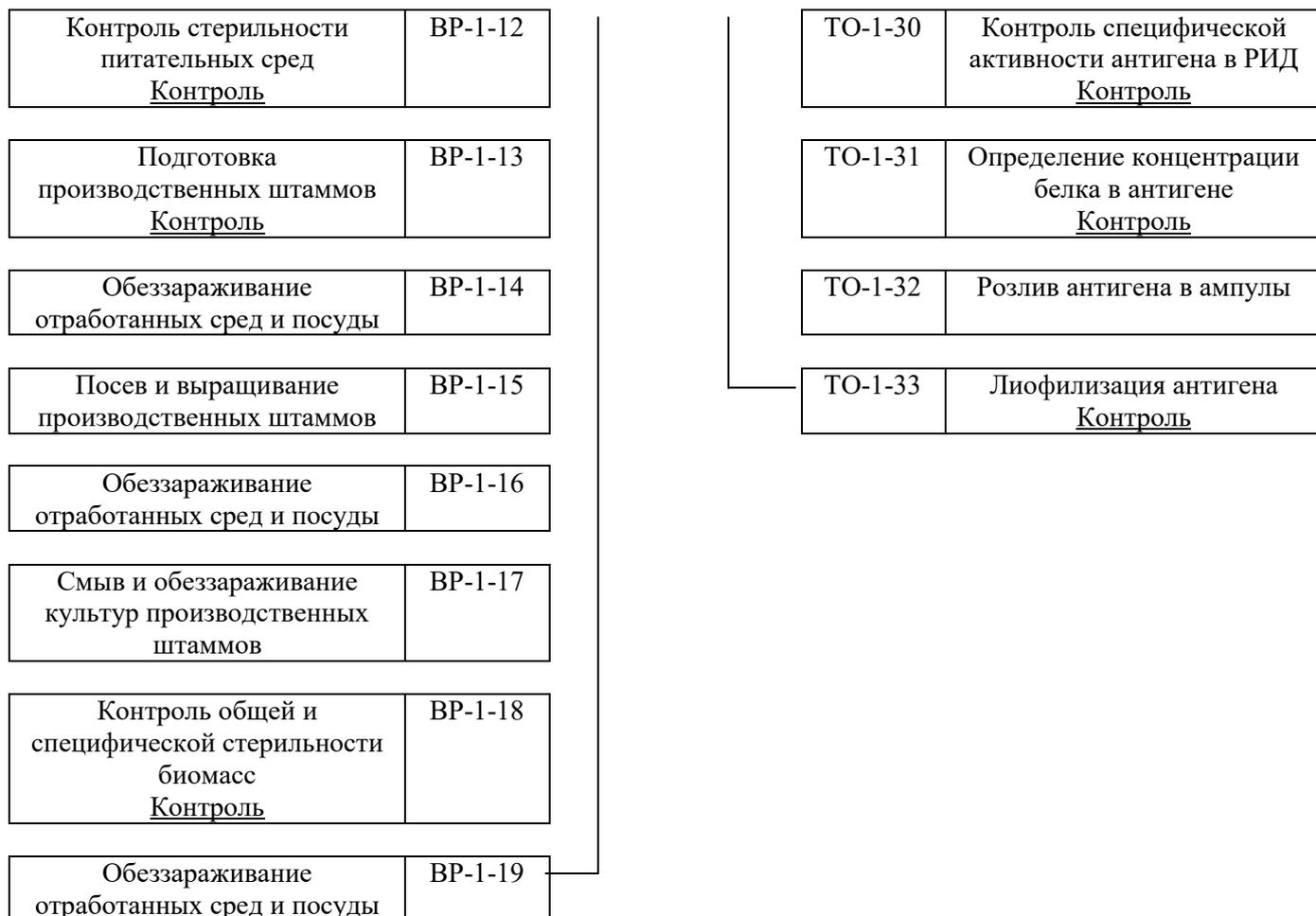


Рисунок 27 – Схема технологического процесса производства набора «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ» по стадиям



Продолжение рисунка 28

Рисунок 28 – Схема технологического процесса получения водорастворимого антигена *F. tularensis*

Продолжение рисунка 29

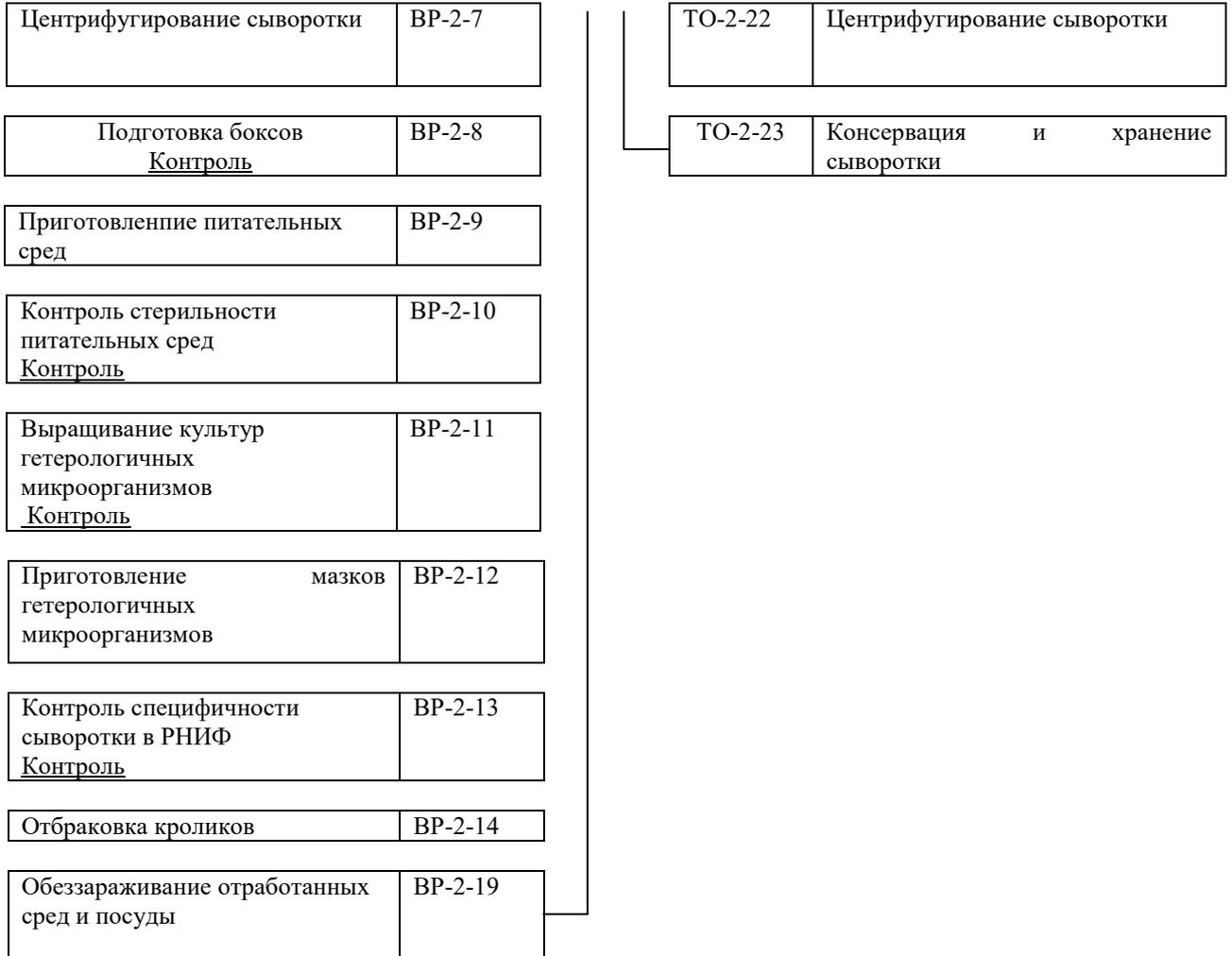


Рисунок 29 – Схема технологического процесса получения гипериммунной сыворотки против *F. tularensis*



Продолжение рисунка 30

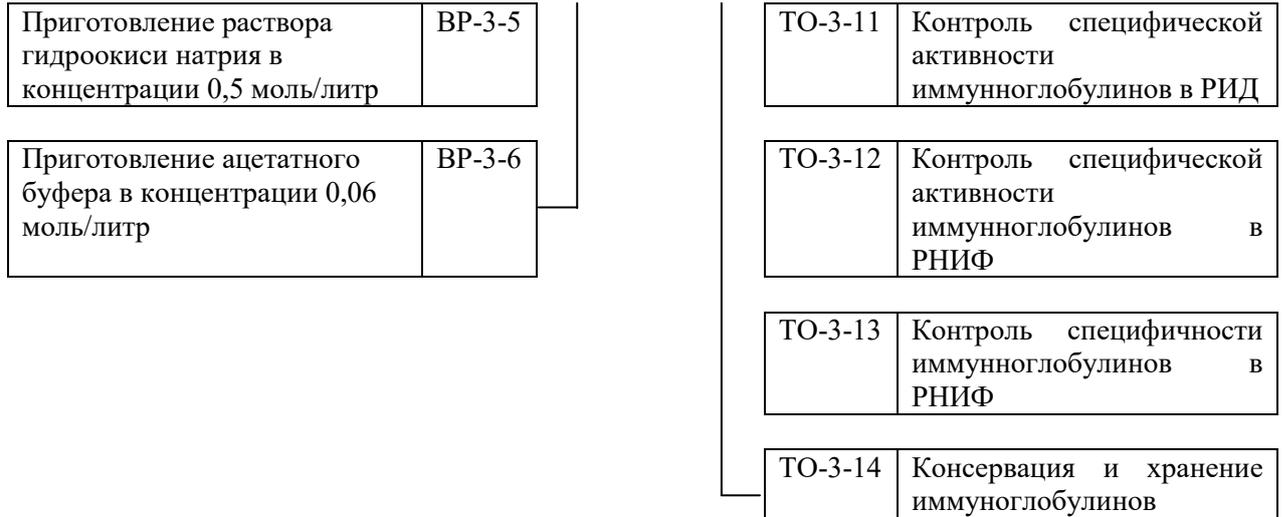
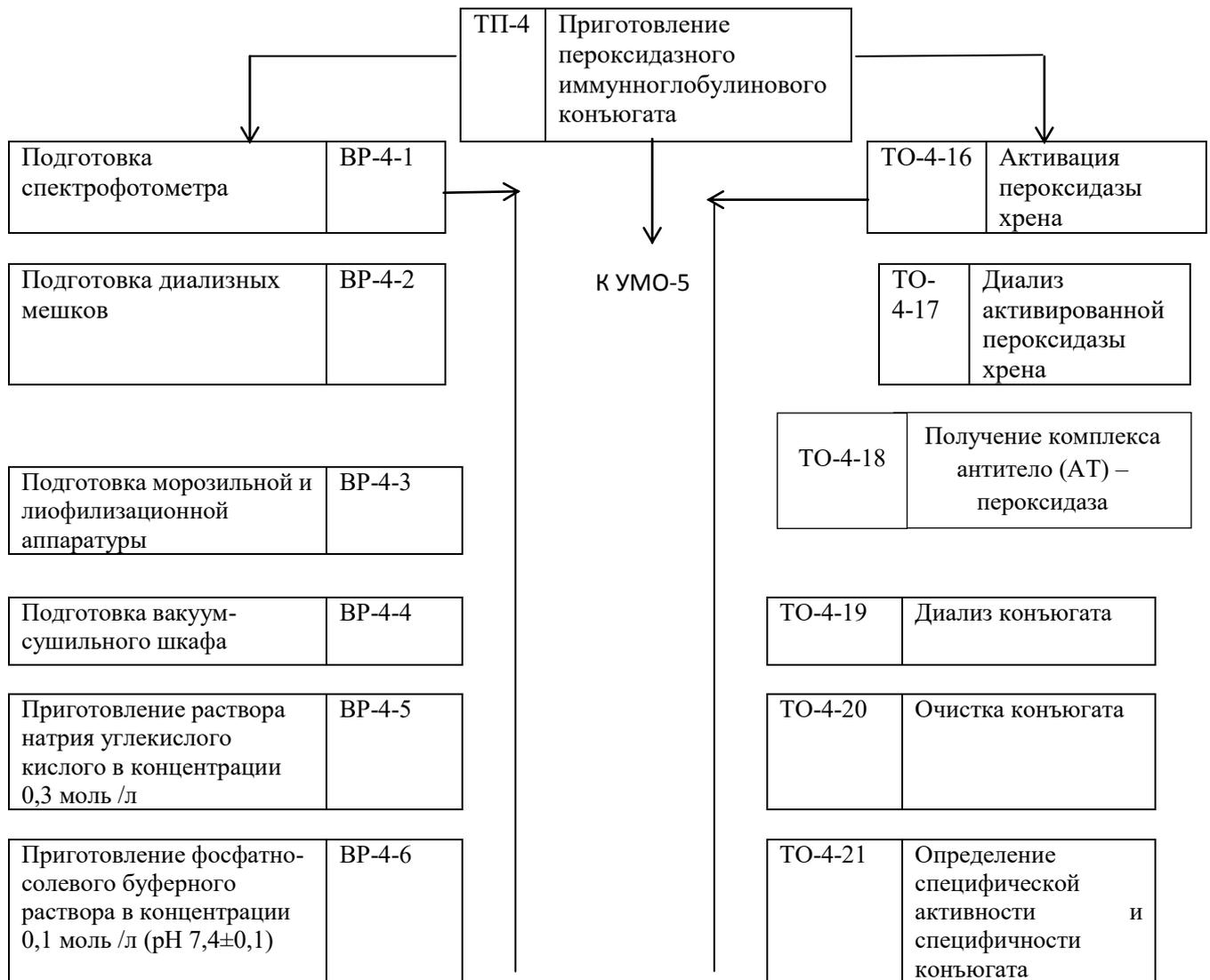


Рисунок 30 – Схема технологического процесса получения специфических туляремийных иммуноглобулинов класса G



Продолжение рисунка 31

Приготовление 0,32% раствора формалина	ВР-4-7
--	--------

Приготовление раствора периодата натрия в концентрации 0,04 моль /	ВР-4-8
--	--------

Приготовление раствора этиленгликоля в концентрации 0,16 моль / л	ВР-4-9
---	--------

Приготовление карбонат-бикарбонатного буферного раствора (КББ) в концентрации 0,01 моль /л, (рН 9,5±0,1)	ВР-4-10
--	---------

Подготовка колонки с сефадексом	ВР-4-11
---------------------------------	---------

Приготовление цитратного буферного раствора	ВР-4-12
---	---------

Приготовление промывочного буферного раствора (ФСБ-Г)	ВР-4-13
---	---------

Приготовление разводящей жидкости (ФСБ-АТ)	ВР-4-14
--	---------

Приготовление 4 N раствора серной кислоты	ВР-4-15
---	---------

ТО-4-22	Добавление к конъюгату консерванта
---------	------------------------------------

ТО-4-23	Розлив препарата в ампулы
---------	---------------------------

ТО-4-24	Лиофилизация конъюгата
---------	------------------------

ТО-4-25	Контроль растворимости, цветности, прозрачности
---------	---

ТО-4-26	Контроль потери в массе при высушивании
---------	---

ТО-4-27	Определение специфической активности и специфичности препарата
---------	--

ТО-4-28	Контроль герметизации
---------	-----------------------

ТО-4-29	Контроль рН
---------	-------------

Рисунок 31 – Схема технологического процесса получения иммуноглобулинового конъюгата для ИФА



Продолжение рисунка 32

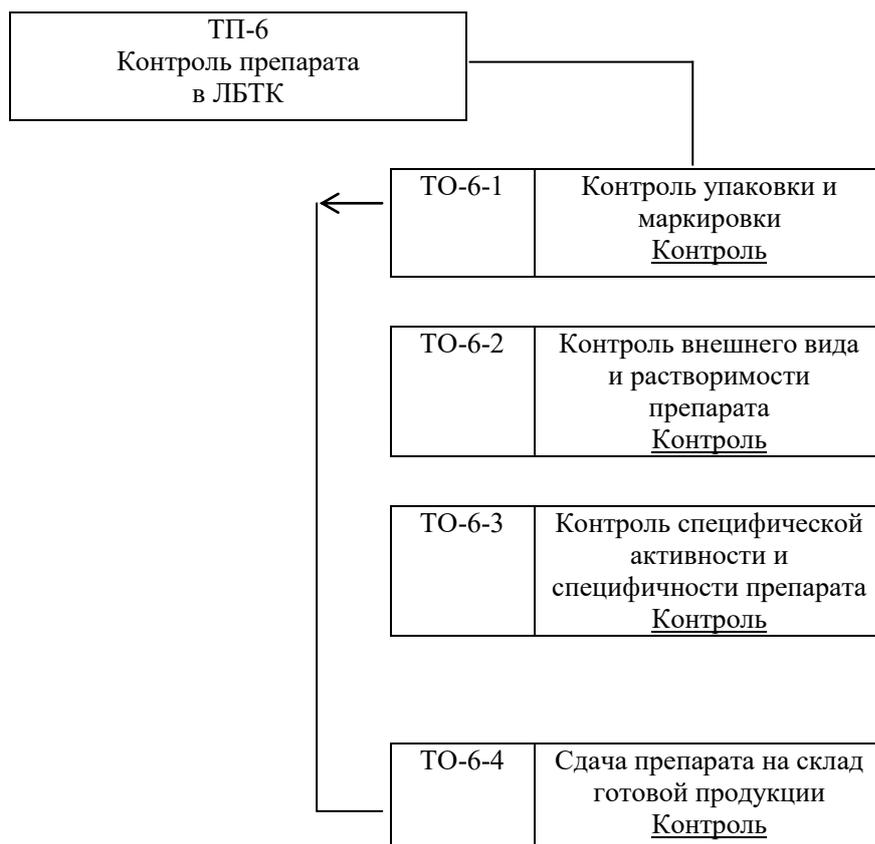


Рисунок 32 – Схема технологического процесса упаковки и контроля готовой продукции

В технологической схеме производства набора использовали следующие индексы: ТП – стадии технологических процессов; ТО – операции технологических процессов; ВР – операции подготовительных и вспомогательных работ; УМО – стадия упаковки, маркировки и отгрузки готового продукта.

Стадии ТП-1, ТП-2, ТП-3, ТП-4 представлены на рисунках 28-31.

Набор реагентов «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ» состоит из следующих компонентов:

- конъюгат пероксидазный иммуноглобулиновый туляремийный;
- иммуноглобулины туляремийные;
- фосфатно-солевой буфер;
- бычий сывороточный альбумин (БСА);
- твин-20;
- цитратный буфер (ЦБ);
- орто-фенилендиамин;

- гидроперит;
- стоп-реагент;
- 2 планшета для иммуноферментного анализа однократного применения.

Нормативная документация (ТУ 9388-010-01897080-2009 и ПУР № 01897080-07-09) на «Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА)» одобрена Ученым советом ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора (протокол № 7 от 09.06.2009 г.) и утверждена директором института. На «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ» получено регистрационное удостоверение № ФСР 2010/06744 от Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, а также сертификат соответствия № 1405369 Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии.

3.1.3. Конструирование тест-системы магноиммуносорбентной для выявления возбудителя туляремии в ИФА

Используя технологическую схему производства СО МС (Глава 3), мы изготовили туляремийный магносорбент и далее на его основе – иммуноглобулиновый магносорбент. Для получения МИС проводили иммобилизацию МС специфическим лигандом, которым служили поликлональные иммуноглобулины класса G из туляремийной гипериммунной адсорбированной сыворотки, выделенные ПЭГ-6000 по методу А. Polson, G.M. Potgier, J.E. Lagrier [211].

Иммобилизацию лиганда проводили следующим образом: к 0,4 мл 10 % взвеси МС добавляли 1,0 мл IgG с концентрацией белка 2,0 мг/мл, инкубировали 2 ч при значении pH раствора 6,0-7,0 и температуре (37 ± 1) °C.

Чувствительность и специфичность туляремийного МИС оценивалась на чистых культурах возбудителя туляремии и гетерологичных штаммов путем постановки «сэндвич» - варианта ИФА,

при этом в качестве твердой фазы вместо традиционных полистироловых планшет использовали разработанный МИС.

Из всех обеззараженных культур готовили микробные взвеси в 0,9 % растворе натрия хлорида, соответствующее 10 единицам ОСО. Для исследования в реакции МИС+ИФА готовили взвеси с концентрацией от $1,0 \times 10^7$ до $1,0 \times 10^2$ м.к./мл.

В микропробирки типа Eppendorf вносили по 50 мкл 10 % взвеси МИС. Далее в микропробирки с отрицательным контролем вносили по 200 мкл ФСБ с альбумином-твином (ФСБ-АТ), в другие микропробирки вносили по 200 взвесей корпускулярных антигенов гомологичных и гетерологичных штаммов микроорганизмов различных концентраций. Все микропробирки со взвесями инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 40 мин. После инкубации жидкость удаляли, придерживая микропробирки постоянным магнитом, используя магнитный сепаратор Dyna Mag-Spin («Invitrogen Dynal AS», Норвегия). МИС два раза промывали фосфатно-солевым буфером с твином (ФСБ-Т). Далее в каждую микропробирку вносили по 200 мкл рабочего разведения пероксидазного конъюгата. Микропробирки с конъюгатом инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 15 мин и промывали ФСБ-Т шесть раз. После этого в микропробирки вносили по 200 мкл субстрат-индикаторного раствора. Учитывали изменения окраски растворов в микропробирках в течение 1-3 мин. Надосадочную жидкость переносили по 100 мкл в лунки планшета полистиролового для иммуноферментного анализа, придерживая микропробирки постоянным магнитом, и останавливали реакцию внесением 50 мкл 4 N раствора серной кислоты. Учет результатов проводили на фотометре для ИФА при длине волны 450 нм. Положительным считали результаты, если оптическая плотность образцов в 2 и более раз превышала оптическую плотность отрицательного контроля.

При проведении ИФА с помощью МИС удалось обнаружить туляремиальные микробы в концентрации, эквивалентной по ОСО $1,0 \times 10^2$ – $1,0 \times 10^3$ м.к./мл. Все изготовленные серии МИС не выявили в ИФА гетерологичные штаммы в концентрации, эквивалентной $1,0 \times 10^5$ м.к./мл и выше. Результаты исследований представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты изучения чувствительности и специфичности туляремиального МИС в ИФА (выборочно)

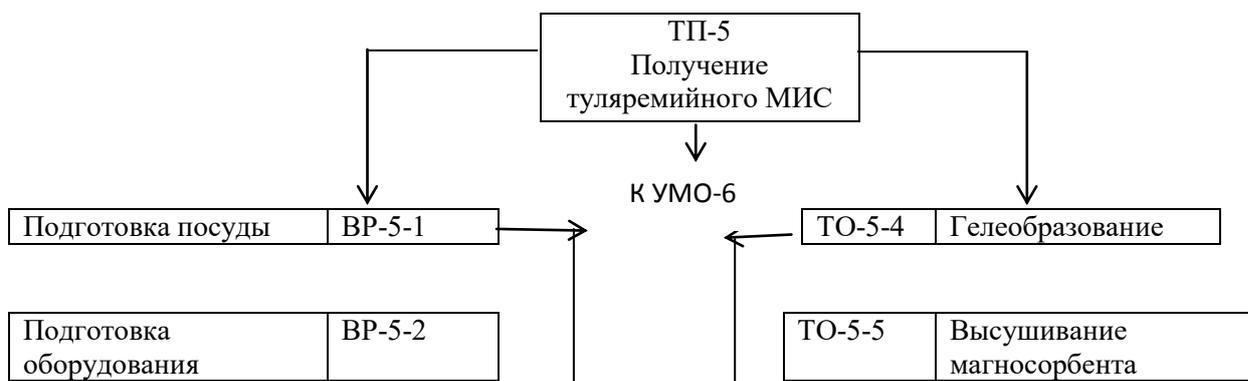
№ п/п	Название штамма	Чувствительность, эквивалентная ОСО 42-28-85П, м.к./мл	
		серия 1	серия 2
1.	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
2.	<i>F. tularensis</i> 144/713	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
3.	<i>F. tularensis</i> 122	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
4.	<i>F. tularensis</i> 319/38	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
5.	<i>Y. enterocolitica</i> 64	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
6.	<i>Y. enterocolitica</i> 178	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
7.	<i>Y. enterocolitica</i> 383	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
8.	<i>Y. enterocolitica</i> 124	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
9.	<i>E. coli</i> 113-3	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
10.	<i>E. coli</i> SA-11	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
11.	<i>S. typhimurium</i> 9640	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
12.	<i>S. typhimurium</i> 7407	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
13.	<i>B. abortus</i> 19BA	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
14.	<i>B. abortus</i> 272	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
15.	<i>B. suis</i> 61	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
16.	<i>B. suis</i> 461	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
17.	<i>B. melitensis</i> Rev-1	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
18.	<i>B. melitensis</i> 14	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$
19.	<i>B. melitensis</i> 93	$>1,0 \times 10^5$	$>1,0 \times 10^5$

Изучение эффективности использования МИС для определения возбудителя туляремии в пробах объектов окружающей среды, искусственно инфицированных гомологичными и гетерологичными микроорганизмами, показало, что туляремиальные МИС выявляли в пробах почвы и воды гомологичные микроорганизмы в концентрации, эквивалентной не менее $1,0 \times 10^3$ м.к./мл, и не выявляли гетерологичные микроорганизмы в концентрации, эквивалентной по ОСО 42-28-85П, $1,0 \times 10^5$ м.к./мл.

На основе проведенных исследований разработана технология изготовления «Набора реагентов тест-системы иммуноформентной магноиммуносорбентной для выявления возбудителя туляремии» («ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ») (Рисунки 28-34).

Обозначение стадии	Наименование стадии
ТП-1	Получение водорастворимого антигена <i>F. tularensis</i>
	↓
ТП-2	Получение иммунной сыворотки против <i>F. tularensis</i>
	↓
ТП-3	Получение туляремиальных иммуноглобулинов
	↓
ТП-4	Получение туляремиального иммуноглобулинового конъюгата
	↓
ТП-5	Получение туляремиального магноиммуносорбента
	↓
УМО-6	Маркировка, комплектация, упаковка
	↓
ТП-7	Контроль готового набора в ЛБТК

Рисунок 33 – Схема технологического процесса производства набора «ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ» по стадиям



Продолжение рисунка 34

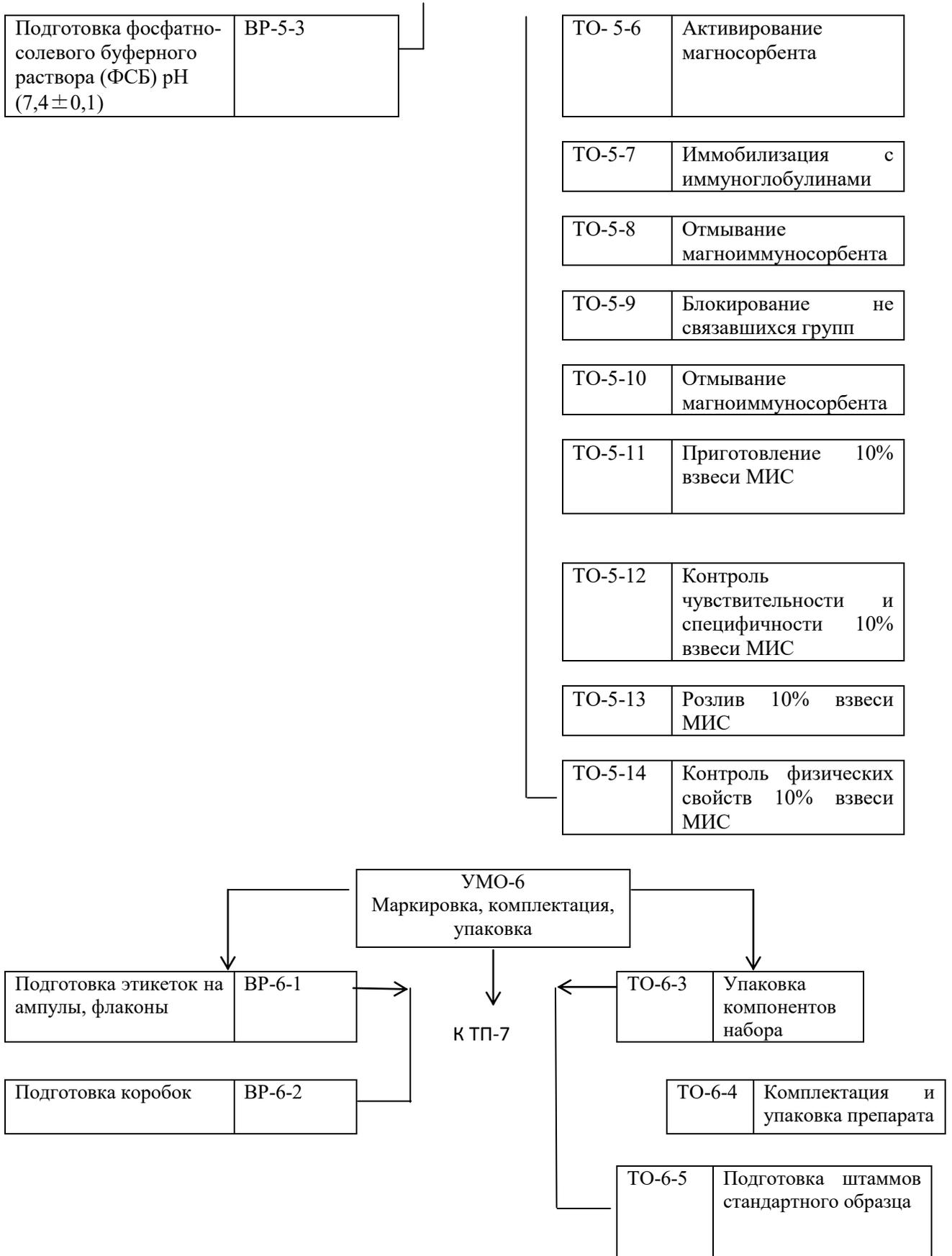




Рисунок 34 – Схема технологического процесса получения туляремийного магноиммуносорбента

В технологической схеме производства набора использовали следующие индексы: ТП – стадии технологических процессов; ТО – операции технологических процессов; ВР – операции подготовительных и вспомогательных работ; УМО – стадия упаковки, маркировки и отгрузки готового продукта

Тест-система «ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ» представляет собой комплект, состоящий из следующих реагентов:

1. 10 % взвесь МИС;
2. Конъюгат пероксидазный иммуноглобулиновый сухой;
3. Взвесь убитой культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ, сухая – $1,0 \times 10^9$ м.к./мл (положительный контроль);
4. Фосфатно-солевой буфер (сухая навеска);
5. Бычий сывороточный альбумин (сухая навеска);
6. Твин 20;
7. Цитратный буфер (сухая навеска);
8. Орто-фенилендиамин (сухая навеска);
9. Гидроперит (таблетка);
10. 4 N раствор серной кислоты;

11. Планшет полистироловый для иммуноферментного анализа (плоскодонный) однократного применения с объемом лунки 0,4 мл;

12. Магнит постоянный (на основе сплава ниодима с железом и бором).

Проведены медицинские испытания тест-системы на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Федерального казенного учреждения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, а также технические испытания на кафедре клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минсоцразвития России (протокол № 359/12 от 12.10.2012 г.). Получено регистрационное удостоверение № РЗН 2013/429 от 04.04.2013 г. Росздравнадзора, а также сертификат соответствия Федерального Агентства по техническому регулированию и метрологии № 1405362, препарат допущен к обращению на территории Российской Федерации и используется в работе лабораторной службы Роспотребнадзора.

3.2. Испытание магноиммуносорбентов в полевых условиях

В 2017 г. (апрель, сентябрь) проведен сбор иксодовых клещей в семи районах Ставропольского края и городах Железноводск, Кисловодск, Пятигорск. На поиск антигена методами ИФА, МИС+ИФА исследованы 1519 экземпляров клещей, объединенных в 276 пулов, в том числе: *Boophilus annulatus* (*B. annulatus*) – 136 экземпляров; *D. marginatus* – 553; *D. reticulatus* – 26; *Ixodes ricinus* (*Ix. ricinus*) – 407; *Haemaphysalis punctate* (*H. punctate*) – 42; *Hyalomma marginatum* (*H. marginatum*) – 257; *Hyalomma scupense* (*H. scupense*) – 54; *Rhipicephalus rossicus* (*Rh. rossicus*) – 44. Клещей для исследования группировали в пулы, учитывая при этом видовую принадлежность, фазу развития,

место сбора, вид хозяина клеща. Результаты представлены в таблицах 11, 12.

Таблица 11 – Обследование административных районов Ставропольского края на туляремию

№ п/п	Административный район СК	Кол-во клещей	Кол-во пулов	Кол-во положительных пулов	
				ИФА	МИС+ИФА
1.	Грачевский	75	5	4	5
2.	Курский	239	21	0	4
3.	Левокумский	281	87	0	16
4.	Минераловодский	28	3	0	0
5.	Нефтекумский	33	7	0	0
6.	Предгорный	350	70	0	0
7.	Степновский	121	36	0	0
8.	Города Железноводск, Кисловодск, Пятигорск	392	47	0	0
	Всего	1519	276	4	25

Таблица 12 – Исследование иксодовых клещей, собранных в административных районах СК на наличие антигена туляремии

№ п/п	Вид клеща	Кол-во клещей	Кол-во пулов	Кол-во положительных пулов			
				ИФА		МИС+ИФА	
				абс.	*%	абс.	*%
1.	<i>B. annulatus</i>	136	6	0	0	0	0
2.	<i>D. marginatus</i>	553	96	4	4,2	11	11,5
3.	<i>D. reticulatus</i>	26	4	0	0	0	0
4.	<i>H. punctata</i>	42	11	0	0	1	9,1
5.	<i>H. marginatum</i>	257	65	0	0	8	12,3
6.	<i>H. scupense</i>	54	37	0	0	1	2,7
7.	<i>Ix. ricinus</i>	407	50	0	0	3	6,0
8.	<i>Rh. rossicus</i>	44	7	0	0	1	14,3
	Всего:	1519	276	4	1,4	25	9,1

Примечание* % от количества исследованных пулов

Как видно из таблиц, положительные находки антигена возбудителя туляремии выявлены в Грачевском районе (четыре пробы в ИФА), а МИС+ИФА – в пяти пробах. В Курском и Левокумском районах в сочетанном методе МИС+ИФА антиген возбудителя туляремии обнаружен в четырех и 16 пробах, соответственно, при этом в ИФА получен отрицательный результат.

Таким образом, проведенные исследования полевого материала показали высокую эффективность разработанных МИБП, при этом следует отметить, что использование магнитной сепарации значительно

повышает чувствительность ИФА, увеличивая вероятность положительных находок и достоверность отрицательного результата.

3.3. Методологические приемы и устройства для забора, транспортировки проб при экологическом, микробиологическом, эпидемиологическом мониторинге объектов окружающей среды

Исследование объектов окружающей среды является эффективным способом обнаружения возбудителя туляремии, так как последний обнаруживает значительную устойчивость в ней, особенно при низкой температуре.

Согласно МУ 3.1.2007-05 «Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией», при исследовании воды из различных водоемов (речек, ручьев, прудов, озер, болот, колодцев и т.п.) 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. При однократном заборе воды на анализ элемент случайности будет скорее правилом, чем исключением. При этом 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.

Нами сконструирована модель плавающей установки, предназначенной для динамического отбора проб воды открытых водоемов с избирательным концентрированием искомых патогенов на специальных магнитных ловушках с МИС (патент РФ на полезную

модель № 133834 (2013)). Устройство установки представлено на рисунке 35.



Рисунок 35 – Общий вид радиуправляемой самоходной плавающей установки

Плавающая установка выполнена в виде поликомандного радиуправляемого катамарана, маневренное перемещение которого по грунту береговой зоны обеспечивается гибкими эластичными гусеницами с фиксированными на них резиновыми грунтозацепами, а по воде – гребным винтом с поднимающимся рулем, функции отбора пробы воды и селекции микробов обеспечиваются тремя рулевыми радиуправляемыми машинками, одна из которых опускает и поднимает плавающую платформу с заборным насадком для отбора воды и магнитной ловушкой с МИС, другая (через центробежный насос) заполняет водой 1 литровую емкость и автоматически отключается за счет силы нагнетаемого потока воды, функция магнитной ловушки на плавающей платформе обеспечивается управляемым рулевой машинкой электродвигателем с миниперистальтическим насосом и расходом жидкости 0,5-1 мл в минуту, радиуправление производится передатчиком и приемником через антенны с обеспечением всех функций установки от автономных аккумуляторных батарей,

находящихся в передатчике и на плавающей платформе катамарана, со светодиодными индикаторами заряда, движения и выполняемых функций.

После необходимого времени работы снимают МИС с ловушки с помощью циангового магнита, далее транспортируют пробы на идентификацию возбудителя инфекции, отмывают 10 раз для освобождения МИС от контаминирующей микрофлоры и других загрязнений и исследуют в ИФА.

Таким образом, нами создан мобильный действующий прибор для микробиологического, эпидемиологического мониторинга открытых водоемов на наличие инфекционного агента. Внедряемая опытно-конструкторская разработка обладает высокой эффективностью, надежностью и возможностью ее использовать для селективного концентрирования возбудителя туляремии на поверхности МИС из большого объема жидкости.

При проведении эпидемиологического расследования в очагах особо опасных инфекций возникает необходимость отбора проб материала, подозреваемого на наличие возбудителя инфекции.

К сохранению, упаковке и транспортировке проб предъявляются требования, направленные на обеспечение основной цели – выделение инфекта.

Известны укладки различной вместимости, рекомендованные для относительно длительного сохранения проб материала при пониженной температуре за счет надежной термоизоляции, применения охлаждающих элементов или химических веществ. В то же время есть основания считать рациональным помещать некоторые пробы сразу после их отбора в условия термостата для подрачивания микроорганизмов, находящихся в пробе. Следует отметить, что в настоящее время укладок, обеспечивающих создание условий, адекватных температуре подрачивания микроорганизмов (чаще это 37 °С)

и/или сохранения материала проб при пониженной температуре, не производится, что, в первую очередь, связано с техническими трудностями.

Современное развитие электроники способствует применению программируемых и управляемых технических устройств и использованию отдельных комплектующих узлов (охлаждающих и нагревательных элементов, терморегуляторов) в специализированных конструкциях для транспортировки проб.

Нами предложен макет унифицированной укладки для транспортировки проб объектов для бактериологического исследования с обеспечением максимального уровня биологической безопасности на этапах отбора проб и их транспортировки (патент РФ на полезную модель № 125976 (2013)).

В основу укладки входит емкость 450×200×370 мм из оцинкованной жести с двухъярусными раздвигающимися компартментами в виде крышки, тремя убирающимися алюминиевыми стойками для размещения укладки на местности или в помещении, наружной термоизоляции поверхности модели термопокрытием с алюминиевой фольгой, дополнительной внутренней термоизоляцией каждого из двух компартментов (охлаждающего и термостатирующего), расположенных у торцевых стенок емкости, выдвигаемым рабочим столиком в виде алюминиевой прямоугольной пластины, поддерживаемой косынкой. Снаружи, поверх термоизоляции, ящик укладки и ее компартменты закрыты прорезиненным чехлом с металлической застежкой-молнией. Охлаждающий и термостатирующий компартменты снабжены термометрами и соответственно обеспечены предварительно охлажденными элементами и терморегулятором с нагревательным элементом (12 вольт). Конструктивные решения отдельных узлов и компартментов укладки основывались на возможности простой и быстрой модификации укладки в отношении как

отбора разнородных проб, с одной стороны, так и достижения максимально удобных условий работы персонала – с другой.

Укладка предназначена для использования в работе специализированных противоэпидемических бригад в условиях чрезвычайных ситуаций, эпидемиологическом и эпизоотологическом обследовании очага инфекционных болезней. Использование укладки на практике направлено на реализацию основной цели: получение достоверных данных о наличии патогенов (возбудителей инфекции и/или ДНК-последовательностей, кодирующих продукцию факторов патогенности) у человека, животных, в объектах окружающей среды.

3.4. Заключение по Главе 3

Относительно невысокая разрешающая способность даже наиболее современных иммуноферментных тест-систем ($1,0 \times 10^6$ – $5,0 \times 10^5$ м.кл./мл), значительно уступающая генодиагностическим тестам, диктует необходимость создания более чувствительных иммунодиагностических препаратов. Серьезные проблемы специфичности результата возникают при исследовании биологического нативного материала, а также объектов окружающей среды. Перспективы совершенствования иммунодиагностики, основанной на взаимодействии специфических антигенов и антител, связаны, прежде всего, с селективным концентрированием в пробе искомого патогена, удалением из нее балластных веществ, обуславливающих неспецифические реакции, с обеспечением объективной автоматизированной регистрацией антиген-антительного взаимодействия.

Используя технологическую схему производства стандартного образца магносорбента, мы изготовили туляремийный МС и далее на его основе – магноиммуносорбент. Для получения МИС проводили иммобилизацию МС специфическим лигандом, которым служили поликлональные иммуноглобулины класса G из туляремийной

гипериммунной адсорбированной сыворотки. Полученный иммуносорбент применен для проведения иммуномагнитной сепарации возбудителя туляремии и детекции его в иммуноферментном анализе, при этом в качестве твердой фазы вместо полистироловых микропланшет, традиционно используемых при постановке ИФА, применяли разработанный нами магнитоуправляемый аффинный сорбент при постановке «сэндвич»-варианта этого метода. Чувствительность модифицированного ИФА составила $1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ м.кл./мл, то есть повышалась на два-три порядка по сравнению с общепринятым ИФА.

Диагностическую ценность сочетанного метода МИС+ИФА на поиск антигена возбудителя туляремии подтвердили и полевые испытания при исследовании 1519 экземпляров иксодовых клещей, собранных в семи районах Ставропольского края и городах Железноводск, Кисловодск, Пятигорск.

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

Разработанные нами тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе и тест-система иммуноферментная магнитоиммуносорбентная для выявления возбудителя туляремии зарегистрированы в Росздравнадзоре, и эти препараты допущены к обращению на территории Российской Федерации.

Глава 4. Отработка технологии элюции антигена с поверхности магнитной иммобилизованной матрицы

Метод иммуномагнитного селективного концентрирования – высокочувствительный, надежный метод выявления патогена в исследуемых образцах. Он позволяет существенно повысить чувствительность индикационных методов, способствует освобождению пробы от различных компонентов биотической и абиотической природы, отрицательно влияющих на проведение реакций.

При постановке «сэндвич»-варианта ИФА+МИС последние сами выступают в качестве твердой фазы, при этом нет необходимости в сенсibiliзированных полистироловых микроплатах, традиционно используемых при проведении ИФА.

Для постановки серологических реакций, таких как РНГА (реакция непрямой гемагглютинации) и РАЛ (реакция агглютинации латекса) после избирательного концентрирования патогена из объектов окружающей среды с помощью МИС целесообразно проводить его элюирование с магнитной иммунной матрицы, используя элюирующие растворы.

С целью оптимизации условий элюции и сохранения целостности возбудителя необходимо исследовать и учесть значительное количество параметров: состав и свойства самой матрицы; рН реакционной среды, молярность и объем элюентов; температурные и временные характеристики инкубации. Для элюции патогена применяются различные реагенты и методики [126, 127]. Их разнообразие зависит от природы используемой матрицы, элюируемого патогена и цели элюирования.

Настоящий раздел работы посвящен подбору элюирующих растворов для разрыва связи антигена с антителами, иммобилизованными на магнитной матрице, и оптимизации условий десорбции МИС для последующего многократного его использования.

Исследования проведены в рамках НИОКР «Разработка магнитоиммуносорбента туляремийного с элюирующими растворами для серологических и генетических исследований» (№ ГР 01201169579).

4.1. Разработка методов десорбции антигенов с поверхности магнитоуправляемых микроразмерных частиц для их детекции в серологических и генетических исследованиях

Растворы, в которых протекает иммунологическая реакция, должны иметь низкую ионную силу (0,01–0,1 моль) и pH в пределах нейтральных значений, так как кислая реакция среды препятствует образованию комплексов Ат-Аг.

Исходя из физико-химических закономерностей взаимодействия Ат-Аг, следует, что наиболее важная функция в молекуле Ат-Аг распознавание и связывание с антигеном. Пара концевых доменов Ат-Аг образуют активный центр (антигенсвязывающий) – NH₂-концевые части H- и L-цепей, уникальную по структуре полость, распознающую в молекуле Аг небольшие дискретные участки, состоящие из 4-8 аминокислот. Эти участки Аг подходят к структуре активного центра, образуя прочные нековалентные связи Аг с Ат. На химическом уровне отличие активных центров Ат определяется первичной структурой концевых доменов H- и L-цепей, то есть последовательностью аминокислот в них [130,170, 184].

При сорбции и элюировании с участием МИС необходимо иметь в виду высокую лабильность антител в присутствии денатурирующих агентов. Концентрированные солевые растворы, например, 3M NaCl, не относят к специфическим элюентам, но они могут быть использованы для ослабления электростатических взаимодействий между антителами и иммобилизованным на носителе антигеном [140, 149].

При подборе элюентов учитывали следующие моменты:

– отсутствие ложноположительных реакций (РНГА, РАЛ) с самим реактивом;

– качественную элюцию (максимальная чувствительность РНГА, РАЛ с элюированным антигеном);

– возможность многократного использования МИС после элюирования.

Для постановки РНГА использовали «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий» (№ ФСР 2011/1027) производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Латексный диагностикум получали по методике, разработанной И.В. Жарниковой [70]. Латексную основу – акролар получали из ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Латекс окрашен в малиновый цвет, со средним диаметром частиц $(1,2 \pm 0,1)$ мкм. Для сенсibilизации матрицы использовали иммуноглобулины туляремийные с концентрацией белка (200 ± 5) мкг/мл. Лиганд соединяли с 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, рН $(7,3 \pm 0,1)$. Сенсibilизацию проводили в течение 9 ч при температуре 50°C на магнитной мешалке. Далее суспензию осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 4-5 мин и дважды отмывали от несвязавшегося лиганда. Осадок суспендировали в белковом стабилизаторе (растворенном 1:50) до концентрации 0,2 % с 0,1 % формалина.

Учет результатов: по феноменам «зонтик», «пуговка» реакцию предварительно учитывали через $(2,5 \pm 0,5)$ ч, а окончательно – через $(21 \pm 0,5)$ 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.

В опытах использованы несколько групп элюирующих реагентов: ферменты, детергенты, кислоты, щелочи, буферные растворы и прочие компоненты.

Предварительно экспонировали взвесь туляремийного микроба в концентрации 1×10^7 м.к./мл с 0,1 мл 10 % с туляремийным МИС в течение 30 мин. От несвязавшегося Аг МИС отмывали шесть раз фосфатно-солевым буфером (ФСБ), рН 7,2. Далее вносили по 0,5 мл исследуемых растворов для элюирования, инкубировали 5, 10, 15, 20, 30 мин при температуре (37 ± 2) °С, сливали элюат, содержащий элюированный антиген, доводили рН до $7,0 \pm 0,2$ и исследовали в РНГА и РАЛ.

Элюирование проводили растворами едкого калия и едкого натрия различной молярности: от 0,02 М до 0,05 М. При постановке РНГА с элюентами установлена ложноположительная реакция с растворами NaOH (Таблица 13).

Таблица 13 – Результаты элюции туляремийного микроба с иммобилизованной магнитной матрицы

Элюент	рН	Ложноположительные результаты с элюентом	Чувствительность в РНГА после элюции	Чувствительность в РАЛ после элюции	Возможность многократного использования
0,02 М КОН	11,3	нет	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	да
0,03 М КОН	11,4	нет	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	да
0,04 М КОН	11,5	нет	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	да
0,05 М КОН	12,1	да	Ложноположительные результаты		
0,02 М NaOH	11,3	нет	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	да
0,03 М NaOH	11,5	да	Ложноположительные результаты		
0,04 М NaOH	11,7	да	Ложноположительные результаты		
0,05 М NaOH	11,8	да	Ложноположительные результаты		

По окончании элюции антиген следовало перевести в нейтральный буфер, а МИС – регенерировать. Для этого МИС промывали 10 объемами щелочного буфера и таким же количеством кислого (рН 8,5 и 4,5 соответственно), добавляя в каждый из них 0,5–1М NaCl, далее уравнивали ФСБ.

Как следует из таблицы, положительные результаты получены с растворами калия едкого 0,02 М и 0,03 М с чувствительностью в РНГА, составляющей $2,5 \times 10^6$ и $2,5 \times 10^5$ м.к./мл, соответственно. При этом отмечено отсутствие ложноположительных результатов и возможность использования МИС после элюции многократно.

Далее мы расширили диапазон используемых элюирующих реагентов.

Ферменты: пепсин, ацидин-пепсин, папаин, трипсин, протеиназа – использовали в растворах различной концентрации. Лучшие результаты получены при применении 1 % пепсина и 0,08 % протеиназы – чувствительность в РНГА и РАЛ составила $1,25 \times 10^6$ м.к./мл и $2,5 \times 10^6$ м.к./мл, соответственно. С папаином наблюдались ложноположительные реакции, с трипсином – отрицательные реакции.

Использовали растворы детергентов различной концентрации: ЭДТА-Na, трис (оксиметиламинометан, гидроксиаминометан), лаурилсаркозил, твин-80, твин-20. Из вышеперечисленных растворов наилучшие результаты получены с 2 % раствором твин-20, чувствительность РНГА и РАЛ составила 1×10^6 м.к./мл и с 0,1 М раствором трис- (оксиметиламинометан) – $2,5 \times 10^5$ м.к./мл. С остальными детергентами отмечены ложноположительные реакции.

При использовании 0,01 М раствора лимонной кислоты; 0,01 М раствора лимонной кислоты с растворами калия и натрия фосфорнокислого одно- и двухзамещенных; 1 М раствора пропионовой кислоты и 0,001 М раствора соляной кислоты регистрировали ложноположительные результаты в РНГА и РАЛ.

Применяли буферные растворы следующего состава: фосфатно-солевой буфер, глициновый буфер, ТРИС-ЭДТА-буфер, тот же буфер, разведенный в 10 раз. В качестве элюентов использовали также растворы ацетата и цитрата натрия; растворы различной молярности натрия фосфорнокислого трехзамещенного, натрия хлорида; 60 % метанол и ацетонитрил; 0,16 М раствор этиленгликоля. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 14 (элюенты с ложноположительными и отрицательными результатами в РНГА в таблице отсутствуют).

Таблица 14 – Выявление туляремийного микроба в РНГА после действия элюирующих растворов на МИС

№ п/п	Элюент	рН раствора	Время инкубации, мин	Результат РНГА
1.	1 % пепсин	4,0	20	$1,25 \times 10^6$
2.	Ацединпепсин 16 % (по пепсину)	1,1	20	$5,0 \times 10^6$
3.	0,08 % протеиназа	8,0	15	$2,5 \times 10^6$
4.	0,1 М раствор трис-(оксиметил)-аминометан	9,7	15	$1,25 \times 10^6$
5.	2 % твин 20	5,6	15	$1,25 \times 10^6$
6.	ТРИС-ЭДТА буфер	8,9	20	$1,25 \times 10^6$
7.	0,2 М ацетат натрия	5,5	15	$2,5 \times 10^6$
8.	0,1 М цитрат натрия	7,96	20	$2,5 \times 10^6$
9.	0,2 М натрий фосфорнокислый трехзамещенный	9,2	20	$2,5 \times 10^6$
10.	0,3 М натрий фосфорнокислый трехзамещенный	14,0	20	$5,0 \times 10^6$
11.	2 М раствор натрия хлорида	7	15	$5,0 \times 10^6$
12.	3 М раствор натрия хлорида	7	15	$5,0 \times 10^6$
13.	0,9 % раствор натрия хлорида-0,1 М HCl	2,7	15	$2,5 \times 10^7$
14.	60 % ацетонитрил	8,5	20	$1,0 \times 10^6$

Для определения воспроизводимости и возможности многократного использования МИС были проведены дополнительные исследования с элюентами, давшими лучшие результаты. Результаты исследований представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Показатели элюции антигена туляремийного микроба после инкубации с МИС

Элюент	pH	Ложно-положительные 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	нет	$1,25 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$	85 %	да	87 %
2 % раствор Твин 20	5,6	нет	$1,25 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	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	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	93 %	да	91 %
ТРИС-ЭДТА буфер	8,9	нет	$1,25 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	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 %

Важным моментом является контроль возможности повторного использования МИС. Для решения данной проблемы отработана следующая технология: к МИС после инкубации с патогеном и его элюирования вносили КПХ туляремийный и учитывали реакцию в ИФА. При качественной элюции антигена результат был отрицательным. Сохранение антител на магнитной матрице после элюции определяли постановкой ИФА с МИС. За положительный результат принимали превышение показаний ОП положительного контроля к отрицательному в два и более раз. Как следует из таблицы 15, нами подобран ряд

элюирующих растворов, позволяющих после промывки МИС использовать его многократно.

Таким образом, в результате проведённых исследований разработан способ элюции возбудителя туляремии с МИС (патент РФ на изобретение № 2535070), 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.

Учитывая особенности МИС и химические свойства элюирующих растворов, был апробирован ряд элюентов с последующей постановкой ПЦР. Выявление ДНК *F.tularensis* проводили методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов на основании амплификации фрагмента видоспецифического участка хромосомы. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 1,7 % агарозном геле с использованием коммерческих наборов производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ». Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см в течение 25-30 мин. Результаты учитывали на основании наличия на электрофореграмме специфичных полос амплификационной ДНК. Результаты ПЦР при использовании элюирующих буферов с применением наборов реагентов для выявления ДНК туляремийного микроба методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов «*Francisella tularensis multiplex-Eph*» производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (экспериментальные серии) и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора «Ген *Francisella tularensis*-РЭФ» представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Выявление ДНК возбудителя туляремии методом ПЦР при использовании различных элюентов

№ п/п	Элюент	Результат выявления ДНК
1.	0,2 М раствор калия едкого	–
2.	0,3 М раствор калия едкого	–
3.	0,4 М раствор калия едкого	–
4.	ТЕ буфер из набора ПЦР	–
5.	0,1 М раствор трис-(оксиметил)-аминометан	–
6.	0,1 М раствор натрия фосфорнокислого трехзамещенного	+
7.	0,3 М раствор натрия фосфорнокислого трехзамещенного	–
8.	0,1 М раствор цитрата натрия	+
9.	16 % ацидин-пепсин	+
10.	ТРИС-ЭДТА буфер	–
11.	0,2 М раствор гидрофосфата натрия	–
12.	60 % ацетонитрил	+
13.	0,1 М раствор лимонной кислоты: 0,2 М раствор натрия фосфорнокислого двузамещенного (9:1)	+

Положительные результаты получены при применении в качестве элюентов 0,1 М натрия фосфорнокислого трехзамещенного; 0,1 М раствора цитрата натрия; 60 % ацетонитрила; 16 % ацидин-пепсина; 0,1 М раствора лимонной кислоты с 0,2 М раствором натрия фосфорнокислого двузамещенного в соотношении 9:1.

Для упрощения выявления возбудителя туляремии в ПЦР после селективного концентрирования его на МИС были также испытаны следующие способы:

- кипячение МИС в течение 30 мин после его инкубации с антигеном и удаления несвязавшегося патогена;

- добавление лизирующего буфера на основе 6 М гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубации в течение 15 мин при температуре (65±1) °С.

Испытания показали положительные результаты в обоих случаях.

Таким образом, при индикации возбудителя туляремии с помощью ПЦР целесообразно после его селективного концентрирования на МИС проводить ПЦР согласно инструкции по применению набора реагентов, т.е. обеззараживание и добавление лизирующего буфера на основе 6 М гуанидинизотиоцианата или использовать метод кипячения МИС.

4.2. Разработка набора реагентов магнимоносорбент туляремийный с элюирующим буфером

Проведенные исследования позволили сконструировать «Набор реагентов магнимоносорбент туляремийный с элюирующим буфером». В технологической схеме производства «Набора реагентов магнимоносорбент туляремийный с элюирующим буфером» использованы следующие индексы: ТП – стадии технологических процессов; ТО – операции технологических процессов; ВР – операции подготовительных и вспомогательных работ; УМО – стадия упаковки, маркировки и отгрузки готового продукта. Технология изготовления набора представлена на рисунках 30, 34, 36 и 37.

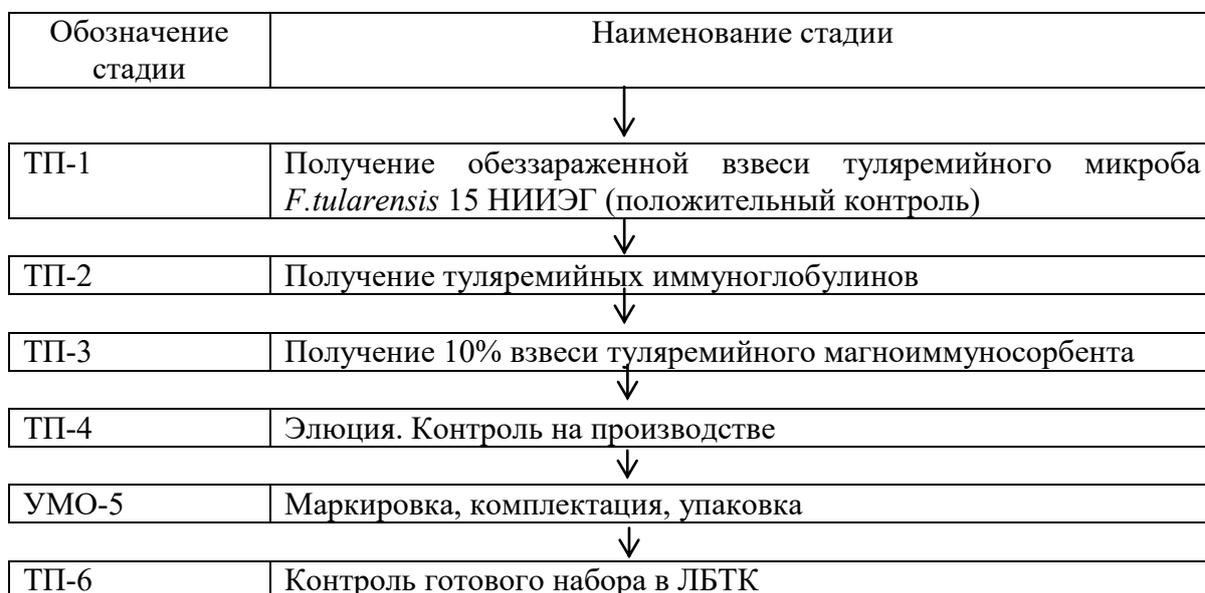


Рисунок 36 – Схема технологического производственного процесса по стадиям

в РНГА при исследовании обеззараженных взвесей микроорганизмов II-IV групп патогенности. Также была проверена возможность многократного использования МИС в ИФА.

Каждый набор состоит из следующих реагентов:

- 10 % взвесь туляремийного МИС – 1 фл. – на 100 определений;
- обеззараженная взвесь туляремийного микроба *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации $1,0 \times 10^9$ м.к./мл – 1 амп.;
- фосфатно-солевой буфер (сухая навеска) – 1 фл.;
- трис-буферный раствор (сухая навеска трис-(оксиметил)-аминометана) – 1 фл.

Оформлен пакет НД, который рассмотрен на Ученом совете ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и утвержден директором института: 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.).

На базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора проведены межлабораторные испытания «Набора реагентов магноиммуносорбента туляремийного с элюирующим буфером». Целью испытаний являлась оценка качественных показателей набора: внешний вид, растворимость, герметизация и определение чувствительности при исследовании гомологичных штаммов в РНГА после проведения элюции селективно сконцентрированного на МИС антигена. Испытания проводили в соответствии с программой межлабораторных комиссионных испытаний, утвержденной директором института, ТУ и инструкции по применению. Результаты испытаний отражены в таблице 17.

Таблица 17 – Качественные показатели «Набора реагентов магнoиммуносорбент туляремийный с элюирующим буфером»

Наименование показателя	Показатели по ТУ 9388-039-01897080-2013	Полученные результаты
1	2	3
Внешний вид: 10% взвесь туляремийного МИС	При стоянии – бесцветная прозрачная надосадочная жидкость, осадок черного цвета; при взбалтывании взвесь черного цвета	При стоянии – бесцветная прозрачная надосадочная жидкость, осадок черного цвета; при взбалтывании взвесь черного цвета
Обеззараженная взвесь туляремийного микроба <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ в концентрации $1,0 \times 10^9$ м.к./мл жидкая (положительный контроль)	Гомогенная взвесь белого или светло-желтого цвета, при стоянии – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость с белым осадком на дне	Гомогенная взвесь белого или светло-желтого цвета, при стоянии – бесцветная или светло-желтого цвета жидкость с белым осадком на дне
ФСБ (сухая навеска)	Сухой порошок без признаков обводнения; после растворения в дистиллированной воде – прозрачная бесцветная жидкость	Сухой порошок без признаков обводнения; после растворения в дистиллированной воде – прозрачная бесцветная жидкость
Трис-буферный раствор (сухая навеска)	Сухой порошок без признаков обводнения; после растворения в дистиллированной воде – прозрачная бесцветная жидкость	Сухой порошок без признаков обводнения; после растворения в дистиллированной воде – прозрачная бесцветная жидкость
Растворимость	Содержимое флаконов с ФСБ и трис-буферным раствором должно полностью растворяться в объеме жидкости, указанном в способе приготовления растворов в течение 3 мин	Содержимое флаконов с ФСБ и трис-буферным раствором полностью растворяется в объеме жидкости, указанном в способе приготовления растворов в течение 3 мин
Герметизация	Флаконы должны быть герметичны	Флаконы герметичны
Чувствительность	Набор должен выявлять штамм туляремийного микроба <i>F. tularensis</i> 144/713 в концентрации $6,25 \times 10^6$ м.к./мл и выше при постановке РНГА микрометодом.	Набор выявляет штамм туляремийного микроба <i>F. tularensis</i> 144/713 в концентрации $6,25 \times 10^6$ м.к./мл и выше при постановке РНГА микрометодом.

4.3. Заключение к Главе 4

Основной задачей представленного исследования являлась отработка технологии элюции туляремийных антигенов с магнитной иммобилизованной матрицы после проведения селективного

концентрирования возбудителя на МИС с последующей постановкой серологических реакций, а также проведение регенерации МИС с целью многократного его использования, что обеспечит сокращение материальных и трудовых затрат и позволит исследовать элюированный антиген в различных серологических методах лабораторного анализа.

В результате проведения многочисленных исследований в плане подбора элюирующих растворов, их молярности, величины рН, температуры и продолжительности элюирования установлено, что целесообразно использовать один из следующих 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. Причем, наиболее активным реагентом явился 0,03 М раствор калия едкого, чувствительность РНГА и РАЛ при его использовании составила $2,5 \times 10^5$ м.к./мл, в то время как у других 1×10^6 м.к./мл.

На «Набор реагентов магноиммуносорбент туляремийный с элюирующим буфером» составлена НД (ПУР, ТУ, инструкция по применению), согласно программы проведены лабораторные и межлабораторные испытания, показавшие соответствие набора заявляемым качественным характеристикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы иммуномагнитной сепарации находят широкое применение в области лабораторной диагностики инфекционных болезней и санитарно-эпидемиологических исследований, т.е. там, где требуется высокочувствительная детекция инфекционного агента в сложных (контаминированных, загрязненных ингибиторами и т.д.) образцах с низкой концентрацией патогена. Повышенный интерес к использованию магнитных носителей представляется правомерным, так как лежит в русле передовых тенденций создания полностью автоматизированных систем экспресс-диагностики патогенных микроорганизмов.

Чрезвычайно высокая чувствительность связывания и особые физико-химические свойства магнитных микрочастиц послужили основой разработки и внедрения в практику тест-систем магноиммуносорбентных для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций бактериальной и вирусной природы в различных лабораторных методах, в том числе в ИФА [10, 165]. В качестве структурных единиц, формирующих остов названных сорбентов, использован кремнезем – алюмосиликат и оксид железа. МИС изготовлены на основе поликлональных иммуноглобулинов класса G, выделенных из гипериммунных кроличьих сывороток.

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,

сформированными в работах В.И. Ефременко [66], И.С. Тюменцевой [164], Е.Н. Афанасьевым [10], И.В. Жарниковой [70].

Основной матрицей при получении МС служил алюминий кремнекислый мета (алюмосиликат). Аллюмосиликат – 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 ± 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.

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.

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.

По внешнему виду и размерам, установленным при использовании атомной силовой микроскопии (сканирующий зондовый микроскоп SPM-9600, Япония), все образцы МС были однородны и соответствовали предъявляемым требованиям.

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 вторичным алкилсульфатом натрия.

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, надсадок 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 экспериментов 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. Установление последовательности технологических операций с оптимальными условиями синтеза позволили выделить процессы, в которых необходимо проводить контрольные измерения, т.е. установить контрольные точки.

При исследовании стабильности основных показателей качества СО МС в процессе хранения методом ускоренного теста образцы выдерживались в термостате при температуре (58 ± 1) °С в течение 14 и 21 сут. Параллельно проводили исследования долговременной стабильности, выдерживая образцы при температуре (5 ± 3) °С и (22 ± 4) °С в течение 6, 12 и 18 мес.

Установлено, что образцы СО МС при температурах хранения (5 ± 3) °С и (22 ± 4) °С были стабильны без изменения внешнего вида, рН и адсорбционной активности в течение 6, 12 и 18 месяцев (срок наблюдения). Более высокая температура хранения образцов (58 ± 1) °С в течение 14 и 21 сут. не влияла на показатели рН адсорбционной активности. Однако наблюдалось изменение цветности надосадочной жидкости в образцах после 21 сут. 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 – 1 год.

Проведены межлабораторные испытания СО МС по следующим показателям: внешний вид, рН, 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).

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.

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*, относящимся 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 щадящий режим дезинтеграции микробных клеток с помощью ультразвуковой установки в сочетании с водно-солевой экстракцией и последующим осаждением белка.

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 – 5×10^4 - 1×10^5 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 афинный сорбент при постановке «сэндвич»-варианта этого метода.

При постановке сочетанного метода МИС+ИФА искомым 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 сенсibilизацию микропланшет – 20-21 ч. При этом значительно увеличился срок хранения сенсibilизованной 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 освободиться 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 магноиммуносorbентной 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 в работе лабораторной службы Роспотребнадзора. Диагностическую ценность названной тест-системы подтвердили полевые испытания при исследовании иксодовых клещей, собранных в семи районах Ставропольского края.

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. При этом 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. Нами разработаны технические устройства для забора проб из объектов окружающей среды с применением МИС (патенты РФ № 125976 от 20.03.2013 г., № 133834 от 27.10.2013 г.).

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 %-ный раствор пепсина, рН 6,2; 2 % раствор твин 20, рН 5,6; 0,03 М раствор калия едкого, рН 11,4; 60 % раствор цетонитрила, рН 8,5; ТРИС-ЭДТА буфер, рН 8,9.

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 – 1×10^6 м.к./мл, что в 4 раза превышало данный показатель.

Таким образом, разработаны условия многократного использования МИС после десорбции антигена, что позволяет экономить трудовые и материальные затраты.

Проведенные исследования позволили сконструировать «Набор реагентов магноиммуносорбент туляремийный 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 туляремийных иммуноглобулинов класса G сконструирован магноиммуносорбент, 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 туляремийных иммунопероксидазных конъюгатов для выявления *F. tularensis*.
4. Сконструирован «Набор реагентов тест-системы иммуноферментной магноиммуносорбентной 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 микропласт, 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 туляремийного 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 монитогинговых 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 туляремиальных моноклональных антител.

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

Аг	– антиген
Ат	– антитело
ИФА	– иммуноферментный анализ
КПХ	– конъюгат пероксидазы хрена
МИБП	– медицинские иммунобиологические препараты
МИС	– магноиммуносорбент
м. к.	– микробная клетка
МС	– магносорбент
МУ	– методические указания
НРИФ	– непрямая реакция иммунофлуоресценции
ООИ	– особо опасные инфекции
ОП	– оптическая плотность
ОСО	– отраслевой стандартный образец мутности (ОСО мутности)
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПОИ	– природно-очаговые инфекции
ПУР	– пусковой регламент
ПХ	– пероксидаза хрена
ПЭГ	– полиэтиленгликоль
РА	– реакция агглютинации
РАЛ	– реакция агглютинации латекса
РИД	– реакция иммунодиффузии
РИФ	– реакция иммунофлуоресценции
РПГА (РНГА)	– реакция пассивной (непрямой) агглютинации
СО	– стандартный образец
ТУ	– технические условия
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер

- ФСБ-АТ – фосфатно-солевой буфер с альбумином и твином 20
- ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с твином 20 (или 80)
- Ig G – иммуноглобулины класса G
- N – нормальный раствор
- pH – отрицательный логарифм концентрации водородных ионов
- Rz – показатель соотношения экстинций при длинах волн 280 и 450

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиева, Е. В. Унификация и разработка тест-систем диагностических для мониторинга возбудителей бактериальной (кампилобактериоз, туляремия, лептоспироз) и вирусной (лихорадка Западного Нила) природы / Е. В. Алиева, А.В. Таран, Е.Е. Афанасьева, Т.В. Жарникова // Вестн. Ставропольского гос. ун-та. – Ставрополь, 2006. – Вып. 47. – С. 292-298.
2. Алиева, Е. В. Аффинные сорбенты для экспресс-диагностики различных заболеваний / Е. В. Алиева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Н.Е. Афанасьев, М.П. Лаврешин, Е.Е. Афанасьева, Т.Н. Орлова, А.Ю. Миронов // Курский науч.-практ. вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 1. – С. 5-9.
3. Алиева, Е. В. Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммунодиагностических препаратов для выявления возбудителей листериоза и кампилобактериоза: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07 / Алиева Елена Васильевна. – Москва, 2008. – 30 с.
4. Алюшин, М. Т. Аэросил и его применение в фармацевтической практике / М. Т. Алюшин, М. Н. Астахов // Фармация. – 1971. – № 6. – С. 73-77.
5. Анисимова, Н. Ю. Новые перспективные сорбенты на основе полистирола, способные элиминировать микроорганизмы из крови / Н. Ю. Анисимова, В.А. Даванков, М.И. Будник, Т.С. Спирина, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал . – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 113-114.
6. Анисимова, Н. Ю. Динамика элиминации бактериальных эндотоксинов и цитокинов из крови онкологических больных с сепсисом при гемосорбции с использованием угольных сорбентов / Н. Ю. Анисимова, Е.Г. Громова, Л.С. Кузнецова, С.М. Ситдикова, М.В. Киселевский // Бюллетень экспериментальной медицины и биологии. – 2011. – Т. 151, № 5. – С. 560- 563.

7. Анисимова, Н. Ю. Исследование сорбционных свойств ферромагнитных наночастиц / Н. Ю. Анисимова, Ф.С. Сенатов, С.И. Миляева, М.В. Киселевский // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – №11. – С. 263-265.
8. Анисимова, Н. Ю. Эффективность применения сверхсшитых полистиролов для экстракорпоральной детоксикации при сепсисе / Н. Ю. Анисимова, В.А. Даванков, Е.А. Корнюшенков, В.В. Митин, О.В. Соловьева, М.И. Будник, Ф.В. Доненко, М.В. Киселевский // *Российский ветеринарный журнал «Мелкие домашние и дикие животные»*. – 2011. – № 2. – С. 23-25.
9. Арипов, Э. А. Природные минеральные сорбенты, их активирование и модифицирование / Э. А. Арипов. – Ташкент: ФАН, 1970 – 250 с.
10. Афанасьев, Е. Н. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва): автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07 / Афанасьев Евгений Николаевич. – Ставрополь, 2000. – 45 с.
11. Афанасьев, Е. Н. Разработка новых подходов к получению гипериммунных сывороток для производства медицинских иммунобиологических препаратов / Е. Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, О.И. Коготкова, Л.В. Ляпустина, И.В. Жарникова, И.В. Савельева, Д.А. Будыка // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2010. – Вып. 1. – С. 67-69.
12. Афанасьева, Е. Е. Лихорадка Западного Нила на юге России: современные эпидемиологические проявления и совершенствование методов выявления возбудителя: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.02.02 / Афанасьева Екатерина Евгеньевна. – Ставрополь, 2010. – 23 с.
13. Базиков, И. А. Разработка новых препаратов для экспресс методов диагностики сифилиса: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.23 / Базиков Игорь Александрович. – Ставрополь, 2000. – 37 с.

14. Басюк, В. А. Иммобилизация азотсодержащих гетероциклических соединений на поверхности дисперсных кремнеземов: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.04 / Басюк Владимир Александрович. – Киев, 1986. – 22 с.
15. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): санитарно-эпидемиологические правила: СП 1.3.3118–13: утверждены врио Главного государственного санитарного врача РФ 28.11.2013. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. – 197 с. – Москва, 2014. – С. 87.
16. Безсмертный, В. Е. К оценке эпидемиологической ситуации по туляремии в Российской Федерации / В. Е. Безсмертный, В. В. Горшенко, В. П. Попов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2008. – № 2 (96). – С. 8-12.
17. Бейер, А. П. Эпидемиологическая обстановка по опасным, зоонозным и природно-очаговым болезням на территории Северо-Кавказского федерального округа / А. П. Бейер, О.В. Малецкая, Н.Ф. Василенко, А.Н. Куличенко // Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ; Ставрополь, 5-6 октября 2010 года: материалы X Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. – 2010. – С. 19-20.
18. Бекболот кызы Бактыгул. Наночастицы аморфного диоксида кремния / Бекболот кызы Бактыгул // Молодой ученый. – 2016. – № 21 (125). – С. 37-39.
19. Беленова, С. В. Сорбционная способность природных сорбентов / С.В. Беленова, В.И. Вигдорович, Н.В. Шель, Л.Е. Цыганкова // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2015. – Т. 20, вып. 2. – С. 388-396.
20. Белова, О. А. Численность и видовой состав мелких млекопитающих на отдельных участках в природном очаге туляремии Ставропольского

- края в 2016 г. / О. А. Белова, Г.П. Шкарлет, Н.В. Цапко, П.Д. Агапитова // Актуальные проблемы болезней общих для человека и животных; Ставрополь, 5-6 апреля 2017 года: материалы II Всероссийской науч.-практ. конф. – 2017. – С. 7-8.
21. Березин, И. В. Аффинный хроматографический сорбент, содержащий группировки конкавалина А, иммобилизованного комплексообразованием с кобальтом / В. Б. Березин, В. М. Лахтин, И. А. Ямсков // Прикладная биохимия и микробиол. – 1995. – Т. 1, № 4. – С. 400-404.
22. Борзенков, В. М. Силохром как сорбент для очистки белков / В. М. Борзенков, М.Г. Теймуразов, В.И. Суровцев, К.В. Детушев // Биотехнология. – 2007. – № 3. – С. 27-30.
23. Борисевич, И. В. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) / И. В. Борисевич, В.Г. Петухов, Р.А. Волкова, О.Б. Устинникова, О.В. Фадейкина // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2010. – № 4 (40). – С. 8-10.
24. Бостанова, Ф. А. Модификация композиционных сорбентов, их строение, физико-химические свойства и применение для иммобилизации аффинных лигандов: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.04 / Бостанова Фатима Аминовна. – Краснодар, 2009. – 18 с.
25. Брей, В. В. Исследование строения поверхности пирогенного кремнезема, модифицированного метилхлорсиланами методом ЯМР²⁹Si / В. В. Брей, Ю. И. Горлов, А. А. Чуйко // Теоретич. и эксперим. химия. – 1968. – Т. 2, № 4. – С. 378-383.
26. Брей, В. В. Исследование структуры гидроксильного покрова пирогенного кремнезема методами ИК-спектроскопии и масспектрометрии / В. В. Брей, Ю.И. Горлов, Э.Н. Король, В.А.

- Назаренко, А.А. Чуйко // Теоретическая и экспериментальная химия. – 1982. – Т. 18, № 1. - С. 122-125.
27. Брыкалов, А. В. Сорбенты на основе кремнеземов и активированных углей / А. В. Брыкалов // Химики северного кавказа народному хозяйству; Нальчик, 23-28 сентября 1991 года: материалы III региональной конференции химиков Северного Кавказа. – 1991. – С. 185-186.
28. Брыкалов, А. В. Получение биопрепаратов на основе методов аффинной сорбции и иммобилизации: автореф. дис. ... докт. хим. наук: 03.00.23 / Брыкалов Анатолий Валерьевич. – СПб., 1993. – 47 с.
29. Брыкалов, А. В. Исследование процессов иммобилизации в биотехнологии получения препаратов липазы / А. В. Брыкалов, О. В. Воробьева, Н. В. Кузминова // Теоретические, практические аспекты основных положений расчета процессов и аппаратов пищевых производств; Москва, 22 апр. 1997 года: тез. докл. к 65-летию МГУ прикладной биотехнологии. – 1997. – С. 14.
30. Брыкалов, А. В. Новые композиционные носители для иммобилизации ферментов / А. В. Брыкалов, О. В. Воробьева // Современные достижения биотехнологии; Ставрополь, июль 1996 года: материалы всерос. конф. – Ставрополь, 1996. – С. 279.
31. Василенко, Н. Ф. Теоретические и прикладные аспекты конструирования магнитоуправляемых твердофазных иммунохимических тест-систем для экспресс-диагностики вирусного гепатита А, Крымской геморрагической лихорадки и детекции их возбудителей: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23 / Василенко Надежда Филипповна. – Ставрополь, 2004. – 40 с.
32. Василенко, Н. Ф. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням на территории Северо-Кавказского федерального округа в 2015 г. / Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Е.А. Манин, Д.А. Прислегина, Т.В. Таран, В.М. Дубянский, Л.И.

- Шапошникова, А.С. Волынкина, Я.В. Лисицкая, Е.С. Котенёв, Г.М. Грижебовский, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 4. – С. 15-19.
33. Василенко, Н. Ф. Мониторинг природно-очаговых инфекций на юге европейской части России в 2016 г. / Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Е.А. Манин, Д.А. Прислегина, Л.И. Шапошникова, А.С. Волынкина, Я.В. Лисицкая, Н.Г. Варфоломеева, А.Н. Куличенко // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. – № 1(298). – С. 30-32.
34. Василенко, Н. Ф. Анализ заболеваемости природно-очаговыми инфекциями на юге европейской части России в 2017 г. / Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Т.В. Таран, Д.А. Прислегина, Е.А. Манин, О.В. Семенко, А.Н. Куличенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 2. – С. 44-50.
35. Василенко, Н. Ф. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций на юге европейской части России в 2017 г. / Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина, Е.А. Манин, О.В. Семенко, Л.И. Шапошникова, А.С. Волынкина, Я.В. Лисицкая, Т.В. Таран, Н.Г. Варфоломеева, Е.В. Герасименко, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 2. – С. 45-49.
36. Вигдорович, В. И. Адсорбционная способность глауконита Бондарского района Тамбовской области / В.И. Вигдорович, Л.Е. Цыганкова, Д.В. Николенко, А.И. Акулов, Ф.А. Румянцев // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10, № 1. – С. 121-126.
37. Вигдорович, В. И. Извлечение ионов меди (II) и фенола в проточном растворе глауконитом Бондарского района Тамбовской области / В.И. Вигдорович, Л.Е. Цыганкова, А.И. Николенко, Д.В. Акулов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10, № 6. – С. 930-937.

38. Владимцева, И. В. Изучение моноклонального сапного магноиммуносorbента методом количественной иммунофлуоресценции / И. В. Владимцева, Н. П. Храпова, В. И. Ефременко, Е. Н. Трофимов, Л. И. Греков, М. Я. Кулаков, А. М. Барков // Особо опасные инфекционные заболевания: диагностика, профилактика и биол. свойства возбудителей: сборник научных работ. – Волгоград, 1990. – Вып. 4. – С. 206-210.
39. Волкова, Р. А. Опыт Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича по разработке и аттестации стандартных образцов медицинских иммунобиологических препаратов / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, О.В. Мовсисянц, И.В. Борисевич // Стандартные образцы. – 2011. – № 4. – С. 17-21.
40. Воробьев, А. А. Оценка вероятности использования биоагентов в качестве биологического оружия / А.А. Воробьев // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – №6. – С. 54-56.
41. Ворошилова, О. И. Синтез и исследование кремнеземных носителей с поверхностью, модифицированной аминопропилтриэтоксисиланом / О. И. Ворошилова, А. В. Киселев // Коллоидный журнал. – 1980. – Т. 42, № 2. – С. 223-229.
42. Гайский, Н. А. Живая туляремийная вакцина / Н. А. Гайский // Журнал микробиологии. – 1944. – № 12. – С. 14-19.
43. Гайский, Н. А. Туляремийный вирус – вакцина, ее получение и применение / Н. А. Гайский. – Иркутск: Издательство «Иркутский противочумный институт». – 1948. – 70 с.
44. Гайский, Н. А. Туляремийный вирус – вакцина, ее получение и применение / Н. А. Гайский. – 2-е изд. – Иркутск, 1948. – 111 с.
45. Герасименко, Е. В. Состояние природного очага туляремии в Ставропольском крае в 2003-2012 гг. / Е. В. Герасименко, Л. В. Дегтярева, Б. И. Левченко, О. А. Гнусарева // Актуальные проблемы

- эпидемиологии и профилактической медицины; Ставрополь, 22-24 октября 2014 года: материалы VI Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2014. – С. 8-9.
46. Герасименко, Е. В. Эпизоотологический мониторинг природного очага туляремии в западных районах Ставропольского края / Е. В. Герасименко, Г. П. Шкарлет // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения; Москва, 16-17 ноября 2017 года: материалы XI съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2017. – С. 198.
47. Гнусарева, О. А. Итоги эпизоотологического мониторинга природного очага туляремии на территории Ставропольского края в 2015 г. / О. А. Гнусарева, А.А. Зайцев, Е.С. Котенев, Т.И. Чишенюк // Здоровье населения и среда обитания; Ставрополь, 16 сентября 2016 года: материалы научно-практической конференции, 20-я ежегодная Неделя медицины Ставрополя. – 2016. – С. 47-52.
48. Гнусарева, О. А. Исторические аспекты проявления эпизоотической и эпидемической активности природного очага туляремии в Ставропольском крае / О. А. Гнусарева, А.А. Зайцев, Е.С. Котенев, Д.С. Агапитов // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных; Ставрополь, 5-6 апреля 2017 года: материалы II Всероссийской научно-практической конференции – 2017. – С.124-125.
49. Голдовская-Перистая, Л. Ф. Изотерма сорбции ионов стронция монтмориллонитгидрослюдными глинами / Л.Ф. Голдовская-Перистая, Н.А. Воловичева, А.И. Везенцев, В.А. Перистый // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т. 11, № 2. – С. 163-171.
50. Гонтарь, И. П. Иммуномодулирующий эффект магносорбентов в терапии ревматических заболеваний / И. П. Гонтарь, И.А. Зборовский, А.В. Александров // V Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»; Москва, 21-25 апреля 1998 года: тезисы докладов. – 1998. – С. 35.

51. Греков, Л. И. Новая технология ковалентной иммобилизации биомолекул на носителях. I. Разработка способа получения сорбентов на основе трис- (гидроксиметил) фосфина / Л. И. Греков, И.В. Владимцева, В.И. Ефременко, А.Б. Чернов // Биотехнология. – 2007. – № 4. – С. 34-40.
52. Грядских, Д. А. Синтез композиционных аффинных сорбентов с магнитными свойствами и их технологическое использование при изготовлении чумных иммунобиологических препаратов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Грядских Диана Анатольевна. – Ставрополь, 2004. – 22 с.
53. Гурина, Н. М. Иммуносорбенты для лечения экспериментального аллергического энцефаломиелита у морских свинок / Н. М. Гурина, Т.М. Кучмеровская // Биотехнология. – 2012. – Т. 5, № 5. – С. 45-53.
54. Дегтярева, Л. В. Заболеваемость туляремией в Ставропольском крае / Л. В. Дегтярева, Б. И. Левченко // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных; Ставрополь, 23-24 мая 2012 года: материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2012. – С. 34.
55. Дегтярева, Л. В. Эпизотические проявления туляремии на территории природного очага Ставропольского края / Л.В. Дегтярева, Б.И. Левченко, Л.В. Ртищева, П.Н. Попов // IV ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным болезням; Москва, 26-28 марта 2012 года: сборник тезисов конференции. – 2012. – С. 114.
56. Директива 2010/63 EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. // СПб., – 2010. – 48 с.
57. Долматов, В. Ю. (Dolmatov V.U.) Доклад на 3th International Symposium Detonation Nanodiamonds: Technology, Properties and Applications; St. Petersburg, 01–04 July 2008 – 2008. – P. 54-58.

58. Дроздов, С. Г. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях / С. Г. Дроздов, Н.С. Гарин, Л.С. Джиндоян. – Москва: Медицина, 1987. – 256 с.
59. Дударева, Г. Н. Исследование сорбции ионов никеля (II) на углеродных сорбентах / Г.Н. Дударева, Г. А. Петухова, А. Т. Н. Нгуен, Ю. С. Сырых // Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2013. – Т. 49, № 4. – С. 389-396.
60. Дюкова, К. Г. Ковалентная иммобилизация очищенной тирозин-фенол-лиазы из *Citrobacter freundii* на неорганических носителях / К. Г. Дюкова, А. А. Амбарцумян, Г. П. Алебян // Биотехнология. – 2011. – № 2. – С. 58-65.
61. Ергунова, О. Р. Магнитные наночастицы в разделении и концентрировании / О.Р. Ергунова, Т.А. Константинова, С.Н. Штыков // Известия Саратовского университета. Новая Серия. Химия. Биология. Экология. – 2014. – Т. 14, вып. 4. – С. 27-35.
62. Ермаков, А. В. Об организации санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий в связи с активизацией природного очага туляремии в Ставропольском крае в 2017 г. / А.В. Ермаков, И.В. Ковальчук, Н.А. Шаповалова, А.В. Сазонов, Л.А. Иванова, Ю.А. Сенатенко, К.А. Пурмак, Д.А. Агапитов, О.В. Малецкая // Здоровье населения и среда обитания; Ставрополь, 10 августа 2017 года: материалы научно-практической конференции. – 2017. – С. 19-27.
63. Ефременко, В. И. Новый метод выделения возбудителей холеры из воды / В. И. Ефременко, С.А. Шаппо, Н.И. Нарбутович, Г.Г. Подзолкова // Особо опасные инф. заболевания: диагностика профилактика и биол. свойства возбудителей: сборник научных работ. – Волгоград, 1990. – Вып. 4. – С. 213 -220.
64. Ефременко, В. И. Магносорбенты в микробиологических исследованиях. Использование магнитных сорбентов для выделения микроорганизмов из объектов внешней среды (Обзор литературы) / В. И.

- Ефременко, И. С. Тюменцева. – Ставрополь, 1995. – 20 с. – Деп. в ВИНТИ 28.12.95, № 3443 – В 95.
65. Ефременко, В. И. Магносорбенты в микробиологических исследованиях. Применение магнитных сорбентов в иммунофлуоресцентном анализе (Обзор литературы) / В. И. Ефременко, И. С. Тюменцева. – Ставрополь, 1995. – 30 с. – Деп. в ВИНТИ 28.12.95, № 3444-В 95.
66. Ефременко, В. И. Магносорбенты в микробиологических исследованиях / В. И. Ефременко. – Ставрополь: Ставрополье, 1996. – 131 с.
67. Ефременко, Д. В. Совершенствование экспрессных методов индикации микобактерий туберкулеза: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.23 / Ефременко Дмитрий Витальевич. – Ставрополь, 2005. – 20 с.
68. Жарникова, И. В. Разработка технологии композиционных магноиммунсорбентов и конструирование на их основе диагностических тест-систем для иммуноанализа возбудителей чумы и туляремии: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Жарникова Ирина Викторовна. – Ставрополь, 1995. – 22 с.
69. Жарникова, И. В. Некоторые аспекты технологии получения органокремнеземных магнитоуправляемых сорбентов / И. В. Жарникова, И.С. Тюменцева, В.И. Ефременко, Е.Н. Афанасьев // Материалы научно практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России; Саратов, 16-18 сентября 1997 года: сб.ст. в 2 т. – Саратов, 1997. – Т. 2. – С. 177.
70. Жарникова, И. В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23 / Жарникова Ирина Викторовна. – Ставрополь, 2004. – 39 с.

71. Жарникова, И. В. Разработка и применение иммобилизованных систем для экспресс-диагностики различных заболеваний / И. В. Жарникова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, В.И. Ефременко, Е.В. Жданова, Т.В. Жарникова, Е.Е. Афанасьева, Т.Н. Орлова, Д.В. Ефременко, М.П. Лаврешин, Н.В. Левченко, А.А. Семирчева, С.А. Курчева, А.М. Бабий // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2008. – Приложение № 2(22). – С. 180-181.
72. Жижаяев, А. М. Взаимодействие меди (II) и цинка (II) при совместном осаждении из сульфатных растворов на природных карбонатах кальция / А.М. Жижаяев, Е.Н. Меркулова // Журнал прикладной химии. – 2014. – Т. 87, № 1. – С. 19-25.
73. Жоголев, В. И. Препараты на основе хитина и хитозана в медицине и рациональном питании / В. И. Жоголев, В. Ю. Никитин, В. Н. Цыган. – СПб., 2000. – 32 с.
74. Зайцев, А. А. Оценка современной эпизоотической активности природного очага туляремии в Ставропольском крае / А. А. Зайцев, О.А. Гнусарева, Т.И. Чищенко, Е.С. Котенев // Здоровье населения и среда обитания; Ставрополь, 16 сентября 2016 года: материалы научно-практической конф, посв. 20-й ежегодной Неделе медицины Ставрополья. – 2016. – С. 54-59.
75. Зайцев, А. А. Заболеваемость туляремией в Ставропольском крае в период 2003-2015 гг. / А. А. Зайцев, О.А. Гнусарева, В.В. Остапович, Е.С. Котенев // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных; Ставрополь, 5-6 апреля 2017 года: материалы II Всероссийской научно-практической конференции. – 2017. – С. 29-30.
76. Зимогляд, А. А. Эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по туляремии в природных очагах Омской области в 2016 г. / А. А. Зимогляд, Н. Н. Павлова // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения; Санкт-Петербург, 16-17 ноября 2017

- года: материалы XI съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2017. – С. 2016.
77. Иванец, А. И. Извлечение ионов Со (II) из водных растворов термически активированным доломитом / А.И. Иванец. И.Л. Шашкова, Н.В. Китикова, Н.В. Дроздова // Журнал прикладной химии. – 2014. – Т. 87, № 3. – С. 303-308.
78. Иванова, В. Т. Взаимодействие вирусов гриппа А и В с сорбентами на основе наноалмазов / В.Т. Иванова, М.В. Иванова, Е.И. Бурцева, Е.О. Гарина, С.В. Трушакова, Е.С. Шевченко, А.А. Манькин, А.А. Исакова, А.П. Корженевский, Б.В. Спицын // Вопр. вирусологии. – 2012. – Т. 57, № 2. – С. 9-13.
79. Иванова, Е. С. Структура и сорбционные свойства Н-формы глины Луговского месторождения Псковской области / Е.С. Иванова, Ю.Ю. Гавронская, В.Н. Пак // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2014. – Т. 14, № 2. – С. 254-259.
80. Иголкина, Л. А. Аффинные сорбенты на основе хитозана для выделения протеолитических ферментов / Л. А. Иголкина, Ю. А. Руденская, Г. Н. Руденская // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2013. – №1. – С. 109-110.
81. Карпенко, В. В. Обезболивание животных в эксперименте: методические рекомендации / М-во здравоохранения СССР; [Сост. Карпенко В. В., Сачков В.И.] – М.: Центр. Ин-т усоверш. врачей, 1985. – 53 с.
82. Касторная, М. Н. Конструирование диагностических препаратов для экспрессных методов лабораторной диагностики бруцеллеза и детекции его возбудителей: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Касторная Маргарита Николаевна. – Ставрополь, 2003. – 20 с.
83. Кельцев, Н. В. Основы адсорбционной техники / Н. В. Кельцев – Москва: Химия, 1984. – С. 280.

84. Клячко-Гурвич, А. А. Методы определения удельной поверхности / А. А. Клячко-Гурвич // Известия АН СССР. – 1964. – № 10. – С. 1884-1886.
85. Кнорре, Д. Г. Исследование поверхности модифицированных образцов нанопористого углеродного композита методом атомно-силовой микроскопии / Д.Г. Кнорре // Материалы VI Московского международного конгресса, посв. биотехнологии: состояние и перспективы развития; Москва, 21-25 марта 2011 года: сб. ст. в 2 ч. – 2011. – Ч.1. – С. – 433-434.
86. Ковальчук, И. В. К вопросу эпидемических проявлений туляремии в Ставропольском крае / И. В. Ковальчук // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения; Санкт-Петербург, 16-17 ноября 2017 года: материалы XI съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2017. – С. 211.
87. Козлова, Т. В. К некоторым вопросам структурно-функциональной организации очага туляремии луго-полевого типа на территории Тульской области / Т. В. Козлова, А. С. Игнаткова // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения; Москва, 16-17 ноября 2017 года: материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2017. – С. 212.
88. Колида, Ю. Я. Магнитные оксиды железа как сорбенты катионов тяжелых металлов / Ю.Я. Колида, А.С. Антонова, Т.Н. Кропачева, В.И. Корнев // Вестник Удмуртского университета. – 2014. – Вып. 4. – С. 52-61.
89. Кудрявцева, Т. Ю. Туляремия: актуальные вопросы и прогноз эпидемической ситуации на территории Российской Федерации в 2018 г. / Т.Ю. Кудрявцева, В.П. Попов, А.Н. Мокриевич, Н.Д. Пакскина, А.В. Холин, А.В. Мазепа, Е.С. Куликалова, Д.В. Транквилевский, М.В.

- Храмов, И.А. Дятлов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – Вып. 1. – С. 22-29.
90. Куличенко, А. Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2017 г.: аналитический обзор / А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина, Н.Ф. Василенко, Т.В. Таран, О.В. Семенко, Е.А. Манин, В.М. Дубянский. – Ставрополь. – 2018. – 112 с.
91. Куличенко, А. Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2017 г.: аналитический обзор / сост. А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина, Н.Ф. Василенко, Т.В. Таран, О.М. Семенко, Е.А. Манин, В.М. Дубянский. – Ставрополь: Литера, 2018. – 111 с.
92. Курочкина, Я. Е. Метод очистки воды и растворов, контаминированных вирусами гриппа, с использованием углесодержащих сорбентов / Я. Е. Курочкина, В.Т. Иванова, А.В. Николаев, А.А. Манькин, Л.А. Баратова, В.Н. Буравцев, А.В. Тимофеева // Материалы IX съезда всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов; Москва, 26-27 апреля 2007 года. – 2007. – Т 1. – С. 247-248.
93. Куфлина, С. А. Эвтаназия экспериментальных животных: методические рекомендации / [Сост. С.А. Куфлина, Т.Н. Павлова]. – М. 1985. – 13 с.
94. Лазарева, Д. Н. Стимуляторы иммунитета / Д. Н. Лазарева, Е. К. Алехин. – Москва: Медицина, 1985. – 255 с.
95. Латкин, А. Т. Иммуномагнитная сепарация с последующей АТФ – метрией в экспресс – индикации шигелл Зонне: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Латкин Александр Тимофеевич. – Москва, 2005. – 18 с.

96. Лихолобов, В. А. Физико-химические особенности процесса углеродных сорбентов полиареином для медицинских и ветеринарных целей / В.А. Лихолобов, Л.К. Герунова, Л.Г. Пьянова, А.В. Седанова // Полимеры в науке и технике; Казань, 10 июня 2014 года: материалы Всероссийской научной интернет-конференции с международным участием, посв. «Сервису виртуальных конференций Pax Grid». – 2014. – С. 31-34.
97. Логунова, Н. А. Особенности развития эпидемиологического процесса туляремии на территории Великоустюгского района / Н. А. Логунова. О. А. Белозерцева, С. В. Стахеев // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения; Москва, 16-17 ноября 2017 года: материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2017. – С. 216.
98. Лягоскин, И. В. Перспективы применения иммуномагнитной сепарации в экспресс-индикации патогенов / И.В. Лягоскин // Материалы Международной научно-практической конференции; Москва, 17-18 апреля 2006 года. – 2006. – С. 160-162.
99. Лягоскин, И. В. Конструирование магноиммосорбента для обнаружения возбудителя сибирской язвы: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Лягоскин Иван Владимирович. – Покров, 2009. – 18 с.
100. Малецкая, О. В. Зоонозные особо опасные инфекции на территории Чеченской республики / О. В. Малецкая, Г. М. Грижебовский, Т. А. Мирзоева // Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств – участников СНГ; Ставрополь, 5-6 октября 2010 года: материалы X Межгосударственной научно-практической конференции государств – участников. – 2010. – С. 79-80.

101. Масленникова, В. Н. Изучение способности ганглиозидных полиакриламидных магносорбентов специфически фиксировать клетки токсигенных штаммов холерного вибриона / В. Н. Масленникова, Н. И. Нарбутович // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей ООИ; Волгоград, 21-22 окт. 1992 года: материалы российской научной конференции. – 1992. – С. 163.
102. Меньшикова, С. В. Аллергические заболевания и энтеросорбция. Научное обоснование проблемы / С.В. Меньшикова, Г.Г. Кетова, М.А. Попилов // Главный врач Юга России. – 2017. – № 4 (57). – С. 67-70.
103. Мещерякова, И. С. Актуальные аспекты эпидемиологии и профилактики туляремии / И. С. Мещерякова, Т. Н. Демидов, В. В. Горшенко // Материал IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов микробиологов и паразитологов; Москва, 26-27 апреля 2007 года – 2007. – Т. 3. – С. 204-205.
104. Мещерякова, И. С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика / И. С. Мещерякова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – № 2. – С. 17-22.
105. Мусеев, Т. С. Анализ современных сорбентов на основе материалов органического происхождения / Т.С. Мусеев, К.В. Солдатов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2017. – № 1. – С. 69-73.
106. Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов: СП 3.3.2.1288-2003: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 17.03.2003. – М.: Минздрав России, 2003. – 80 с.
107. Новиков, Н. Л. Проблемы эпизоотологического надзора за природными очагами туляремии / Н. Л. Новиков // Материалы IX съезда ВОЭМП; Москва, 26-27 апреля 2007 года: сб. ст. в 3 т. – 2007. – Т. 3. – С. 210-211.

108. Определитель бактерий Берджи (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Nine Edition. Ed. John G. Holt et al.). – Москва: Мир, 1997. – С. 86, 112, 147.
109. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2012 г.: Государственный доклад [Электронный ресурс]. – Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2013. – 200 с. – Режим доступа: <https://www.rospotrebnadzor.ru/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2012-godu.pdf>.
110. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 г.: Государственный доклад [Электронный ресурс]. – Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2016. – 200 с. – Режим доступа: [gd_2015_ds.pdf](#).
111. Окунев, Л. П. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация в природных очагах туляремии Сибирского и Дальневосточного федеральных округов в 2010 г. и прогноз на 2011 г. / Л. П. Окунев, А. В. Мазепа // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Вып. 1 (107). – С. 29-30.
112. Олсуфьев, Н. Г. Туляремия / Н. Г. Олсуфьев // Медгиз – Москва, 1960. – С. 51-95, 136-207.
113. Онищенко, Г. Г. Борьба с инфекционными болезнями – приоритетная тема председательства Российской Федерации на саммите «Группа восьми» в 2006 г. / Г. Г. Онищенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – № 7. – С. 3-7.
114. Онищенко, Г. Г. Роль Российской Федерации в международных усилиях в борьбе с инфекционными болезнями на современном этапе / Г. Г. Онищенко, В. Ю. Смоленский // Перспективы сотрудничества государств – членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных

- болезней; Новосибирск, 14-15 мая 2009 года: тезисы докладов Международной научно-практической конференции. – 2009. – С. 29-34.
115. ОСТ 64-02-003-2002. Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок, разработка, согласование и утверждение. – Введ. 2003-04-15. – Москва, 2002. – 83 с.
116. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – Москва: Наука, 1985. – 536 с.
117. Пастухов, А. В. Магнитные нанокompозиты на основе сверхсшитых полистиролов / А. В. Пастухов, В.А. Даванков, В.В. Волков, К.А. Дембо, Я.В. Зубавичус, А.А. Корлюков, А.Г. Филатова // Известия РАН. Серия физическая. – 2009. – Т. 73, № 4. – С. 496-498.
118. Пастухов, А. В. Структура и свойства магнитных композитных сорбентов на основе сверхсшитых полистиролов / А. В. Пастухов, В.А. Даванков, К.И. Лубенцова, Е.Г. Косандрович, В.С. Солдатов // Журнал физической химии. – 2013. – № 10. – С. 17-21.
119. Патент 1084300 Союз Советских Социалистических Республик. МПК С 12 N 11/14, Способ получения иммобилизованных протеолитических ферментов / А. В. Брыкалов, В.И. Ковальков, В.П. Тельбух, С.И. Кольцов; заявитель и патентообладатель Ставропольский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток. – № 3486754/28-13; заявл. 27.08.1982; опубл. 07.04.1984, Бюл №13. – 8 с.
120. Патент 2327517 Российская Федерация, МПК ВО1J 20/20, СО1В 31/04. Сорбент на основе ультрадисперсного графита для детоксикации и стерилизации жидких или газообразных сред и способ его получения / В.Н. Буравцев, А.В. Чебышев, А.С. Ботин, А.В. Николаев, Т.С. Попова; заявитель и патентообладатель Буравцев Владимир Николаевич, Чебышев Александр Васильевич, Ботин Александр Сергеевич – № 2007105452/15; заявл. 14.02.2007; опубл. 27.06.2008, Бюл. 18. – 13 с.

121. Патент 1692580 Союз Советских Социалистических Республик, МПК А 61 К 39/02. Способ получения туляремийного антигена / Н. Ф. Василенко, И.В. Кронгауз, Л.О. Лопаткин, Г.И. Басилова, И.В. Жарникова; заявитель и патентообладатель Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. – № 4676656/13; заявл. 11.04.89; опубл. 23.11.91, Бюл. 43. – 6 с.
122. Патент 2441674 Российская Федерация, МПК А61М 1/38, А61К 38/43, А61К 38/17, А61Р 37/00. Способ очистки крови от ДНК-содержащих иммунных комплексов с помощью комбинированного сорбента / И. П. Гонтарь, Е.С. Симякова, А.С. Трофименко, Н.А. Зборовская; заявитель и патентообладатель Гонтарь Илья Петрович, Симакова Екатерина Станиславовна, Трофименко Андрей Степанович, Зборовская Ирина Александровна. – № 2010128583/14; заявл. 2010.07.09; опубл. 10.02.2012, Бюл. 4. – 8 с.
123. Патент 2329505 Российская Федерация, МПК G01N33/531. Способ получения иммуносорбента для связывания вирусспецифических антител / В.Т. Иванова, Я.Е. Курочкина, Л.А. Баратова, А.В. Тимофеева, В.Н. Буравцев, А.В. Николаев; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Российской академии медицинских наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук. – № 2007105449/15; заявл. 14.02.2007; опубл. 20.07.2008, Бюл. № 20. – 8 с.
124. Патент 2372951 Российская Федерация, МПК 61Р 31/16(2006.01), G01N 33/50, G01N 33/53, G01N 33/531, G01N 33/569. Полианилин в качестве сорбентов для удаления вирусов, белков невирусной природы в качестве основы иммуносорбентов, способ удаления или фиксации вирусов с помощью этих сорбентов, способ иммуносорбции с помощью

- этих сорбентов / В. Т. Иванова, В.Ф. Иванов, О.Л. Грибкова, Я.Е. Курочкина, Р.О. Матюшина, А.В. Ванников; заявитель и патентообладатель Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН. – № 2007129444; заявл. 01.08.2007; опубл. 20.11.2009, Бюл. № 32. – 15 с.
125. Патент 264369 Союз Советских Социалистических Республик, МПК C01b 33/14 C01b 33/26. Способ приготовления аэросилогелей / А. В. Киселев, Г.Л. Кустова, Б.А. Липкинд, Ю.С. Никитин; заявитель и патентообладатель Московский ордена Ленина и ордена Трудового Красного знамени Государственный университет им. М.В. Ломоносова. – № 1248155/23-26; заявл. 10.06.68; опубл. 15.10.75, Бюл. № 38. – 4 с.
126. Патент 2372939 Российская Федерация, МПК A61K 39/395, C07K 16/06. Способ получения иммуноглобулина / К. В. Курищук, М. М. Скрипник, Н. Ю. Диденко В.А. Самойленко, О.В. Куркина; заявитель и патентообладатель Курищук К. В., Скрипник М. М., Диденко Н. Ю. – № 2007146417/15; заявл. 17.12.2007; опубл. 20.11.2009, Бюл. № 32. – 8 с.
127. Патент 2392331 Российская Федерация, МПК C12Q1/70. Способ получения стандартной положительной панели сывороток крови для контроля качества иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления специфических антител к вирусным респираторным инфекциям в биологических жидкостях организма крупного рогатого скота / И. Н. Матвеева, И.И. Кочиш, Н.А. Бондарева, С.В. Кузнецова, Н.К. Еремец, Л.С. Люлькава, И.А. Бараковский, Д.А. Салов, Е.В. Рахманина; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСХН. – № 2008132390/13; заявл. 07.08.2008; опубл. 20.06.2010, Бюл. № 17. – 8 с.
128. Патент 2135210 Российская Федерация, МКИ A61K 39/40. Способ получения диагностической сыворотки / И. С. Тюменцева, Е.Н.

- Афанасьев, В.И. Ефременко, И.А. Базиков, Е.В. Алиева; заявитель и патентообладатель Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. – № 97114296/13; заявл. 19.08.97; опубл. 27.08.99, Бюл. № 24. – 5 с.
129. Патент 2325172 Российская Федерация, МПК А61К 35/16, А61К 39/395, А61К 39/44, А61М 1/36. Сорбент для удаления иммуноглобулинов / С.Н. Покровский, О.А. Дмитриева, О.И. Афанисьева, Е.В. Алтынова, С.Г. Кипор; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (ФГУ РКНПК Росздрава), Закрытое акционерное общество научно-производственная фирма «Покард». – № 20061266445; заявл. 24.07.2006; опубл. 28.05.2008, Бюл. №15. – 8 с.
130. Петров, Р. В. Иммунология / Р.В. Петров. – Москва: Медицина. – 1983. – 368 с.
131. Пичурина, Н. Л. Определение активности очага туляремии в Ростовской области с использованием проблемно-ориентированных баз данных / Н. Л. Пичурина // Перспективы сотрудничества государственных ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней; Новосибирск, 14-15 мая 2009 года: тезисы докладов международной научно-практической конференции. – 2009. – С. 165-168.
132. Пичурина, Н. Л. Влияние антропогенных воздействий на фауну носителей туляремии в природных очагах Ростовской области / Н. Л. Пичурина, Э. А. Москвитина, И. В. Орехов // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 06(219). – С. 43-46.
133. Плавильщиков Н. Н. Определитель насекомых. Краткий определитель наиболее распространенных насекомых Европейской части России / Н.Н. Плавильщиков. – Москва: Топикал, 1994. – 544 с.

134. Плаченев, Т. Г. Разработка конструкции поромеров для изучения структуры пористых тел методом вдавливания ртути. / Т. Г. Плаченев // Журнал прикладной химии. – 1965. – Т. 28, № 3. – С. 245-25.
135. Подзолкова, Г. Г. Применение количественной иммунофлуоресценции для определения адсорбционной способности магнитных сорбентов / Г. Г. Подзолкова, И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, О.И. Быкова, Р.Г. Ярулин // Журнал микробиологии. – 1988. – № 5. – С. 56-58.
136. Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев) [Электронный ресурс]: Утверждено Министерством здравоохранения Российской Федерации (23 апреля 2003 г.) и президиумом РАМН (22 апреля 2003 г.). – 2003. – 6 с. – Режим доступа: <https://docplayer.ru/29376252-Polozhenie-o-kontrole-kachestva-laboratornyh-zhivotnyh-pitomnikov-i-eksperimentalno-biologicheskikh-klinik-vivariiev.html>
137. Помазкина, О. И. Адсорбция катионов никеля (II) природными цеолитами / О.И. Помазкина, Е.Г. Филатова, Ю.Н. Пожидаев // Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2014. – Т. 50, № 3. – С. 262-267.
138. Померанцев, Б. И. Паукообразные иксодовые клещи (Ixodidae). Фауна СССР / Б.И. Померанцев. – Москва: Ленинград: Издательство Академии наук, 1950. – Т. IV, Вып. 2. – 223с.
139. Потапов, В. Нанодисперсный диоксид кремния: применение в медицине и ветеринарии / В. Потапов, С. Мурадов, В. Сивашенко // Наноиндустрия. – 2012. – №3-33. С. 32-36.
140. Практическая химия белка: учебное пособие / под ред. А. Дарбе. – Москва: Мир. – 1989. – С. 22-23.
141. Приказ МЗ и соцразвитие РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практике» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010, № 18713) 2010. – 22 с.

142. Продукция иммунобиологических лекарственных средств и наборов реагентов для иммунодиагностики *ин витро*: методические рекомендации. – М., 2010. – 105 с.
143. Пьянова, Л. Г. Применение модифицированных энтеросорбентов для коррекции иммунотоксических эффектов синтетических пиретроидов и противопаразитарных препаратов / Л.Г. Пьянова, Л.К. Герунова, В.А. Лихолобов, А.В. Седанова, Т.В. Герунов // Биотехнология: состояние и перспективы развития; Москва, 17-20 марта 2015 года: материалы VIII Московского междунар. конгресса. – 2015. – С. 145-147.
144. Пьянова, Л. Г. Создание и перспективы использования модифицированных сорбентов в ветеринарной медицине / Л.Г. Пьянова, Л.К. Герунова, В. А. Лихолобов, А.В. Седанова // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2016. – № 2 (22). – С. 138-146.
145. Раев, М. Б. Биотехнология углеродных наночастиц в диагностике инфекционных заболеваний [Электронный ресурс] / М.Б. Раев, П.В. Храмов, М.С. Бочкова // Бюллетень Оренбургского научного Центра УРО РАН. – 2016. № 2. – С. 17. – Режим доступа: <http://www.elmag.uran.ru>.
146. Рогутский, С. В. Результаты эпидемиологического мониторинга за циркуляцией возбудителя туляремии в Смоленской области / С. В. Рогутский, Л.М. Сидоренкова, Л.Б. Рудковская, Т.А. Парфенова // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения; Москва, 16-17 ноября 2017 года: материалы XI съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2017. – С. 228.
147. Романенко, А. А. Получение магнитных микросфер иммуномагнитной сепарации клеток [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: www.magneticliquid.narod.ru › medicine / 006.htm 2014.

148. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. – National Acad. Press Washington, D. C. – 1996. – 138 p.
149. Русанова, Т. Ю. Нанопористые золь-гель материалы с иммобилизованными антителами для иммуноаффинного концентрирования пирена / Т. Ю. Русанова, Н.А. Левина, Н.А. Юрасов, И.Ю. Горячева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, Вып. 3. – С. 391-398.
150. Савин, А. В. Сорбционное связывание углеводов и условнопатогенных микроорганизмов неорганическими сорбентами (на примере бензола и *E. coli*) / А. В. Савин, А.П. Денисова, Р.Х. Хузиахметов, С.А. Неклюдов, В.А. Бреус // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т 15, № 19. – С. 123-126.
151. Самсонов, Г. В. Принципы хроматографии / Г. В. Самсонов // Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров / под ред. Г. В. Самсонова. – Москва: Ленинград: Наука, 1966. – С. 109-124.
152. Сведения об информационных и паразитарных заболеваниях за январь-декабрь 2016 г. Информация. // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2017. – № 1. – С. 78-81.
153. Скворцов, Н. В. Эффективный сорбент для элиминации эндотоксина в биопрепаратах генно-инженерного генеза и биологических жидкостях / Н. В. Скворцов, В.О. Самойлов, И.В. Ларионов, А.Г. Болдырев // Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского гос. политехнического университета. Физ.-мат. науки. – 2013. – № 177. – С. 177-181.
154. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство / под ред. Г. Г. Онищенко. – Москва, 2006. – С. 69-70.

155. Стрелков, А. А. Влияние иммуно-магнитосорбции на морфологию популяции салмонелл / А.А. Стрелков // Ветеринария. – 2010. – № 9. – С. 40-42.
156. Тамбовцев, Е. П. Методы статистической обработки результатов серологических реакций / Е. П. Тамбовцев, С. Г. Ахметкалиев, Н. П. Пятницкий // Журнал микробиологии. – 1969. – № 10. – С. 26-31.
157. Темежникова, Н. Д. Применение иммуномагнитных сорбентов при санитарно-эпидемиологическом мониторинге легионелл и других патогенов внешней среды / Н.Д. Темежникова // Наука и бизнес: пути развития. – 2011. – № 4. – С. 11-20.
158. Тертых, В. А. О размещении структурных гидроксильных групп на поверхности аэросила / В. А. Тертых, В. В. Павлов, К. И. Ткаченко, А.А. Чуйко / Теоретическая и экспериментальная химия. – 1975. – Т. 11, № 3. – С. 415-420.
159. Тертых, В. А. Химические аспекты иммобилизации ферментов на неорганической матрице / В. А. Тертых, В.В. Янышпольский // Адсорбция, Адсорбенты. – Киев: Наукова Думка, 1980. – № 8. – С. 3-27.
160. Тертых, В. А. Особенности хемосорбции спиртов на поверхности кремнеземов / В. А. Тертых // Адсорбция и адсорбенты. – 1983. – Вып. 11. – С. 3-11.
161. Тертых, В. А. Химические реакции с участием поверхности кремнезема / В. А. Тертых // Кремнеземы в медицине и биологии: сборник научных трудов. – Киев: Ставрополь, 1993. – С. 41-51.
162. Тимофеева, А. В. Изучение сорбции антибиотиков-гликопептидов на ультрадисперсном углеродном сорбенте / А. В. Тимофеева, В.Н. Буравцев, О.А. Галатенко, И.В. Толстых, Л.П. Терехова, А.В. Николаев, Л.А. Баратова, Г.С. Катруха // Биотехнология. – 2010. – № 2. – С. 70-80.
163. Тимофеева, А. В. Новый ультрадисперсный углеродный сорбент (УДУС). Исследование условий десорбции некоторых антибиотиков-гликопептидов. / А. В. Тимофеева, В.Н. Буравцев, И.В. Толстых, Л.А.

- Баратова, Е.В. Хряпова, Г.С. Катруха // Биотехнология. – 2011. – № 1. – С. 53-59.
164. Тюменцева, И. С. Научно-методические основы конструирования и усовершенствования производства диагностических тест-систем для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций: дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07 / Тюменцева Ирина Степановна. – Ставрополь, 1996. – 327 с.
165. Тюменцева, И. С. Иммуномагнитные сорбенты для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний: аспекты биотехнологии и опыт применения / И. С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Л.В. Ляпустина, О.И. Коготкова, И.В. Жарникова, В.И. Ефременко, Д.А. Будыка, Н.Ф. Василенко, Е.Е. Афанасьева, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – Вып. 101. – С. 59-61.
166. Тюменцева, И. С. Разработка тест-систем магноиммуносорбентных для выявления холерного вибриона в объектах окружающей среды / И. С. Тюменцева, Е.И. Афанасьев, И.В. Савельева, И.В. Жарникова, Е.В. Жданова, С.А. Курчева, О.Л. Старцева, А.Н. Куличенко // Здоровье населения и среда обитания. – 2014. – № 4(253). – С. 17-19.
167. Тюпенко, Г. И. Электрофорез сульфата хитина для устранения дефектов слизистой полости рта / Г. И. Тюпенко, И. Н. Горбачева, Е. Е. Скорикова // Новые достижения и перспективы в исследовании хитина и хитозана; Москва, 22-24 октября 2001 года: материалы VI Международной конференции. – 2001. – С. 238-241.
168. Тюпенко, Г. И. Электрофорез хитозана при лечении заболеваний пародонта / Г. И. Тюпенко, Е. Е. Скорикова, А. Б. Зезин // Новые достижения и перспективы в исследовании хитина и хитозана; Москва, 22-24 октября 2001 года: материалы VI Международной конференции. – 2001. – С. 241-247.
169. Фрайфельдер, Я. Физическая химия. / Я. Фрайфельдер. – Москва: Мир, 1980. – 418 с.

170. Хаитов, Р. М. Иммунология / Р.М. Хаитов. – Москва: ГЭОТАР – Медиа, 2016. – 366 с.
171. Ходж, Ф. Органические реакции с использованием реагентов или субстратов, ковалентно закрепленных на функционализированных неорганических носителях / Ф. Ходж // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. – 1989. – Т. 34, № 3. – С. 331–339.
172. Черкасов, А. Н. Получение и свойства лизоцима, иммобилизованного на силихроме / А. Н. Черкасов, Н. А. Кравченко, В. Н. Павловский // Биоорганическая химия. – 1976. – Т. 2, № 10. – С. 1422-1428.
173. Чиркст, Д. Э. Изотерма сорбции ионов стронция на глине / Д.Э. Чиркст, Т.Е. Литвинова, М.В. Иванов, Н.А. Мироненкова // Журнал прикладной химии. – 2003. – Т. 76, № 5. – С. 755-758.
174. Чуйко, А. А. Строение поверхности пирогенного кремнезема, природа его активных центров и механизмы сорбционных процессов / А. А. Чуйко, Ю. И. Горлов // Кремнеземы в медицине и биологии: сборник научных трудов. – Киев – Ставрополь, 1993. – С. 4-41.
175. Шапошников, А. А. Микроструктурные и наноструктурные природные энтеросорбенты: строение, свойства и действие на живые системы / А.А. Шапошников, Ю.В. Фуман, Н.Г. Габрук // Социальная политика и социология. – 2011. – №10 (76). – С. 294-303.
176. Швагер, М. М. Факторы эпидемического риска туляремии в Ростовской области / М. М. Швагер, А.Ю. Гончаров, Л.В. Курущенко, А.В. Полонский, В.В. Сидельников // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения; Санкт-Петербург, 16-17 ноября 2017 года: материалы XI съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – 2017. – С. 241-242.
177. Шендерова, О. А. Современные наноалмазы динамического синтеза для биотехнологических медицинских применений / О. А. Шендерова,

- И. С. Ларионова, С. С. Хенс // Известия высших учебных заведений. Серия: химия и химическая технология. – 2010. – № 10. – С. 28 – 73.
178. Яновский, Ю. Г. Сравнительные исследования сорбционной эффективности и структуры поверхности нано- и микроразмерных магнитоуправляемых частиц для их использования в медицине и биологии / Ю.Г. Яновский // Технологии живых систем. – 2007. – Т. 4, № 5-6. – С.73.
179. Alexiou, C. Medical applications of magnetic nanoparticles. / C. Alexiou, R. Jurgons, C. Seliger, H. Iro // J. Nanosci Nanotechnol. – 2006. – № 6 (9-10). – P. 2762-2768.
180. Bilkenroth, U. Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cells separation / U. Bilkenroth, H. Taubert, D. Reimann, U. Rebmann, H. Heynemann, A. Meye // Int. J. Cancer. – 2001. – P. 82-577.
181. Mc Coy, G. W. Bacterium tularensis the cause of plague-like disease of rodents / G. W. Mc. Coy, C. W. Chapin // Pub. Health Bull. – 1912. – № 53. – P. 17-23.
182. Clark, M. F. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus / M. F. Clark, A. N. Adams // J. Gen. Virol. – 1977. – Vol. 36, № 3. – P. 475-483.
183. Cuin R. M. Mc. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation / R. M. Mc. Cuin // J. Microbiol. Methods. – 2001. – P. 69-76.
184. Debra J. Immunoglobulins: structure and functions / Debra J. Jaske, J. Donald Capra // Infect Fundamental Immunology. – 1984. – Vol. 1(7). – P. 204-254.
185. Dierich, M. P. Quantitative elution studies in experimental immune complex and nephrotoxic nephritis / M. P. Dierich, R. A. Reisfeid // Clin. exp. Immunol. – 1977. – Vol. 10 – P. 334-341.

186. Dodin, A. Diagnostic du vibrion Cholérique au laboratoire / A. Dodin, B. Goud // Bull. Pathol. Exot. – 1989. – V. 76. – P. 644-651.
187. Equrani, D. E. Copper and zinc removal from aqueous solution by mixed mineral systems / D.E. Equrani, A.R. Baker, J.E. Andrews // J. Coll. Interface Sci. – 2005. – Vol. 291. – № 2. – P. 319-325.
188. Equrani, D. E. Copper and zinc removal from aqueous solution by mixed mineral systems the role of solution composition and aging / D.E. Equrani, A.R. Baker, J.E. Andrews // J. Coll. Interface Sci. – 2014. – Vol. 418. – № 1. – P. 326-333.
189. Gijs, M. A. Magnetic particle handling microsystems for miniaturized analytical applications / M. A. Gijs // Conf. Proc IEEE Eng Med. Biol. Soc. – 2007. – P. 4088-4089.
190. Grishko, V. Synthesis, Properties and Applications of Ultrananocrystalline Diamond / V. Grichko, O. Ch. Shenderova // William-Andrew: Norwich. UK, 2004. – P. 283-287.
191. Grinde, B. Sensitive detection of group A rotaviruses by immunomagnetic separation and reverse transcription-polymerase chain reaction / B. Grinde, T. O. Jonassen, H. Ushijma // J. Virol. Microbiol. – 1993. – P. 8-31.
192. Гудзенко, Т. В. Вилучення кадмія із водніх розтворів природними сорбентами с іммобілізовані бактерії роду *Pseudomonas* / Т. В. Гудзенко // Проблеми екологічної біохнології. – 2013. – № 2 (4). – С. 22-32.
193. Gubitz, G. Direct separation of 2-hydroxy acid enantiomers by high performance liquid chromatography on chemically bonded chiral phases / G. Gubitz, S. Mihellyes // Chromatographid. – 1984. – Vol. 19. – P. 257-259.
194. Halbreich, A. Biomedical applications of maghemite ferrofluid / A. Halbreich // Biochimie. – 1998. – V. 80, № 5-6. – P. 379-390.
195. Hallier-Soulier, S. An immunomagnetic separation-reverse transcription polymerase chain reaction (IMS-RT-PCR) test for sens and rapid detection of viable waterborne *Cryptosporidium parvum* / S. Hallier-Soulier, E. Guillot // Environ Microbiol. – 2003. – P. 8-592.

196. Ho, Dean. *Nanodiamonds in Biology and Nanoscale Medicine* Springer / Dean Ho. – 2010. – 286 p.
197. Ilakoon, N. Use of iron oxide magnetic nanosorbents for Cr (VI) removal from aqueous solutions: A review / N. Ilakoon // *J. of Engineering Research and Applicatio.* – 2014. – Vol. 4. – P. 55-63.
198. Ito, A. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles / A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, T. Kobayashi // *J. Biosci. Bioeng.* – 2005. – P. 1-11.
199. Ivanov, V. F. Virus sorbents on polyaniline interpolimer complexes, composites and their sorption properties / V. F. Ivanov, V. T. Ivanova, A.L. Gribkova, Y.E. Kurochkina, R.D. Matushina // *In: Materials of AIP Conference Proceedings.* – 2010. – P. 46-48.
200. Knight, E. Human fibroblast interferon. An improved purification / E. Knight, Jr. & D. Fahey // *J. Biol. Chem.* – 1981. – Vol. 256 (8). – P. 3609-3611.
201. Lacin, O. Modeling of adsorption and ultrasonic desorption of cadmium (II) and zinc (II) on local bentonite / O. Lacin, B. Bayrak, P. Korkut, E. Sayan // *J. Coll. Interfase Sci.* – 2005. – Vol. 292 (2). – P. 330-335.
202. Liu, B. Microwave-assisted modification on montmorillonite with ester-containing Gemini surfactant and its adsorption behavior for triclosan Original Research Article / B. Liu, J. Lu, Yu. Xie, B. Yang, X. Wang, R. Sun // *J. Coll. Interfase Sci.* – 2014. – Vol. 418 (1). – P. 208-215.
203. Lea, T. Magnetic monosired polymer pasticles for fast and specific fractionation of human mononuclear cell / T. Lea, F. Vartdal, C. Davies // *Scand. J. Immunol.* – 1985. – Vol. 22 (2). – P. 207-216.
204. Lynch, M. J. Evaluation of an automated immunomagenetic separation method for the rapid detection of *Salmonella species* in poultry environmental samples / M. J. Lynch, C.G Leon-Velagde, S. McEwen, A. Odumeru // *J. Microbiol. Methods.* – 2004. – P. 8-285.

205. Magnani, M. The use of magnetic nanoparticles in the development of new molecular detection systems / M. Magnani, L. Galluzzi, I. J. Bruce // *J. Nanosci Nanotechnol.* – 2006. – Vol. 6 (8). – 2302-2311.
206. Maurer, H. R. Disc electrophoresis and Related techniques of polyacrylamide gel. Electrophoresis working methods in modern science. / H. R. Maurer. – 1971. – 248 p.
207. Nakane, D. K. Peroxidase – Labelled antibody – a new method of conjugation / D. K. Nakane, A. Kawaoi // *J. Histochem. Cytochem.* – 1974. – Vol. 22. (4). – P. 506 – 508; 1084-1091.
208. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology / O. Olsvik, T. Popovic, E. Skjerrve, K.S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1994 – Vol. 7 (1). P. 43-54.
209. Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gel / O. Ouchterlony // *Arkiv. for Kemi Mineral. o. Geol.* – 1949. – Vol. 261 (14) – P. 1-9.
210. Peruski, A. H. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents / A. H. Peruski, L. F. J. Peruski // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2003. – № 10 (4). – P. 506-513.
211. Polson, A. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight / A. Polson, G. M. Potgieter, J. E. Largier // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1964. – Vol. 82. – P. 463-475.
212. Puzyr, A. P. The adsorption of aflatoxin B1 by detonation-synthesis nanodiamonds / A. P. Puzyr // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2007. – № 417. – P. 299-304.
213. Ramadan, O. Flow-through immunomagnetic separation system for waterborne pathogen isolation and detection: application to *Giardia* and *Cryptosporidium* cell isolation. / O. Ramadan, L. Christophe, W. Teo, S. Li, H.H. Feng // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – P. 8-592.
214. Rascati, R. J. Purification and Properties of Cytochrome c Oxidase from Rat Liver Mitochondria / R. J. Rascati, P. Parsons // *J. Biol. Chem.* – 1979. – №254. – P. 1586-1593.

215. Rotariu, O. Multiple sample flow through immunomagnetic separation for concentrating pathogenic bacteria / O. Rotariu // *Phys. Med. Biol.* – 2005. – P. 77-2967.
216. Rubin, B. Characterization of New Antigenic Determinants Introduced into Homologous Serum Albumin by Dinitrophenylation and Sulphanylation / B. Rubin, B. Aasted // *Immunology.* – 1973. – Vol. 25. – P. 399-408.
217. Safarik, I. Magnetic nanoparticles and biosciences / I. Safarik, M. Safarikova // *Monatsh. Chem.* – 2002. – Vol. 133 (6). – P. 737-759.
218. Safarik, I. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides / I. Safarik, M. Safarikova // *Biomagn. Res. Techol.* – 2004. – Vol. 2 (1). – P. 709.
219. Slabough, W. H., Parsons, T. D. General chemistry. / W. H. Slabough, T. D. Parsons // *Jahu Wiley and Sons Inc.* – 1976. – P. 71-73.
220. Strkenstein, E. Uber Permentwirkung und deren Beeinflusung durch Neutralsalze / E. Strkenstein // *Biochem.* – 1910. – № 24. – P. 210-218.
221. Schneider, C. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix / C. Schneider // *J. Biol. Chem.* – 1982. – №257 (18). – P. 10766-10769.
222. Shelton, D. R. Evaluation of parameters affecting quantitative detection of *Escherichia coli* 0157 in enriched water samples using immunomagnetic electrochemiluminescence / D. R. Shelton, J.A Van Kessel, M.R. Wachtel, K.T Belt, J.S. Karns // *J. Microbiol. Methods.* – 2003. – P. 717-725.
223. Shinkai, M. Functional magnetic particles for medical application / M. Shinkai, A. Ito // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2004. – P. 191-220.
224. Singh, K. K. Removal of Cr (VI) from wastewater using rice bran / K.K. Singh, R. Rastogy, S.H. Hasan // *J. Coll. Interface Sci.* – 2005. – Vol. 290. – №1. – P. 61-68.
225. Smith, K. O. Magnetic transfer devices for use in solid-phase radioimmunoassays and enzyme-linked immunosorbent assay / K. O. Smith, W. D. Gehl // *J. Infect. Diss.* – 1977. – Vol. 136. – P. 5328-5336.

226. Srivastava, P. Competitive adsorption behavior of heavy metals on kaolinite / P. Srivastava, B. Singh, M. Angove // *J. Coll. Interface Sci.* – 2005. – Vol. 290. – №1. – P. 28-38.
227. Teutly–Sequeira, A. Comparison of aluminium modified natural materials in the removal of fluorid ions Original Research Article / A. Teutly -Sequeira, M. Solache-Ríos, V. Martínez-Miranda, I. Linares-Hernández // *J. Coll. Interfase Sci.* – 2014. – Vol. 418, № 1. – P. 254-260.
228. Turkova, J. Affinity chromatography / J. Turkova // *J. Chromatography Labrary.* – 1978. – Vol. 12. – P. 471.
229. Warburg, O. Isolierung und Kristallisation des Garugsterments Enolase / O. Warburg, W. Christian // *Biochem. Z.* – 1941. – Vol. 310. – P. 384-421.
230. Weber, K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis. / K. Weber, M. Osborn // *J. Biol. Chem.* – 1969. – Vol. 244 (16). – P. 789-794.
231. Weetall, H. H. Covalent attachmend of proteins to inorganic supports directional activation cyanogen bromide / H. H. Weetall, C. C. Detor // *J. Biotechnol. And Biogen.* – 1975. – Vol. 17. – P. 295-297.
232. Weller, T. H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitrol / T. H. Weller, A. H. Coons // *Proc. Soc. Exp. Biol.* – 1954. – Vol. 86. – P. 789-794.
233. Wilson, M. B. Recent devetopments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRRO) to antibodies / M. B. Wilson, P. K. Nakane // *Immunofluorescence and related staining techniques.* – New York: Elserier (North Holland, Biochemical Prese), 1978. – P. 215-244.
234. Yang, K. Rapid concentration of bacteria using submicron magnetic anion exchangers for improving PCR-based multiplex pathogen detection / K. Yang, D. M. Jenkins, W. W. Su // *J. Microbiol. Methods.* – 2011. – Vol. 86(1). – P. 69-77.

235. Yavus, C. T. Low-Field Magnetic Separation of Monodisperse Fe_3O_4 Nanocrystals / C.T. Yavus, J.T. Mayo, W.W. Yu // *Science*. – 2006. – Vol. 314. – P. 964-967.
236. Zhao, J. Preparation of biodegradable magnetic microspheres with poly (lactic acid) – coated magnetic / J. Zhao, K. Soatchi, U. O. Häfel // *J. Magnetism, Magnetic Materials*. – 2009. – Vol. 321, № 10. – 354-359 p.
237. Zhao, J. Chitozan-coated mesoporous microspheres of Calcium silicate hydrate: Environmentally friendly synthesis and application as a highly efficient adsorbent for heavy metal ions Original Research Article / J. Zhao, Y.-J. Zhy, J.-O. Zheng, X-Yu.Zhao, B.-O.Lu, F. Chen // *J. Coll. Interface Sci*. – 2014. – Vol. 418, №1. – P. 208-215.

ПРИЛОЖЕНИЯ

39

19



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

№ РЗН 2013/429

от 04 апреля 2013 года

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Федеральное казённое учреждение здравоохранения "Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора), Россия, 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15 и подтверждает, что медицинское изделие
Набор реагентов тест-система иммуноферментная магнитоимносорбентная для выявления возбудителя туляремии «ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ» по ТУ 9388-006-01897080-2012 производства
Федеральное казённое учреждение здравоохранения "Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора), Россия, 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15 место производства:
Россия, 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15

класс потенциального риска 3 ОКП 93 8883

вид медицинского изделия –

соответствующее регистрационному досье № 43721 от 12.12.2012

В соответствии с приказом Росздравнадзора от 04 апреля 2013 года № 1246-Пр/13 допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Приложение: на 1 листе

Врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения  М.А. Мурашко
0006509

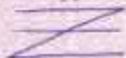
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

Лист 1

№ РЗН 2013/429

- Набор реагентов тест-система иммуноферментная магнимоносорбентная для выявления возбудителя туляремии «ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ»:
- 10 % взвесь туляремийного МИС (1 флакон);
 - конъюгат пероксидазный иммуноглобулиновый туляремийный (1 ампула);
 - обеззараженная взвесь туляремийного микроба *Francisella (F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации $1,0 \times 10^9$ микробных клеток в 1,0 мл (м.к./мл) сухая (положительный контроль) (1 ампула);
 - фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (сухая навеска) (1 флакон);
 - бычий сывороточный альбумин (БСА) (сухая навеска) (1 флакон);
 - твин-20 (1 флакон); тетраметилбензидин (ТМБ) (1 флакон);
 - 4 N раствор серной кислоты (стоп-реагент) (1 флакон);
 - планшет для иммуноферментного анализа однократного применения, с объемом лунки 0,4 мл (1 шт.);
 - скарификатор дисковый ампульный керамический СДАК 19-01 (1 шт.);
 - инструкция по применению и паспорт на серию.



Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

04 апреля 2013 года

0000468



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 26 декабря 2012 года № ФСР 2010/06744

На медицинское изделие
Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА) ("ИФА-Тул-СтавНИПЧИ") по ТУ 9388-010-01897080-2009

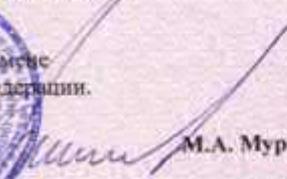
Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Федеральное казенное учреждение здравоохранения "Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора), Россия, 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15

Производитель
Федеральное казенное учреждение здравоохранения "Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора), Россия, 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15
Место производства медицинского изделия 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15
Номер регистрационного досье № 17802 от 29.05.2012
Вид медицинского изделия -

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 26

Код Общероссийского классификатора продукции для медицинского изделия 93 8830

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе приказом Росздравнадзора от 26 декабря 2012 года № 3317-Пр/12 и приказом от 12 декабря 2013 года № 7235-Пр/13 о замене допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения  М.А. Мурашко

0006349

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 26 декабря 2012 года № ФСР 2010/06744

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА) ("ИФА-Тул-СтавНИПЧИ") по ТУ 9388-010-01897080-2009

- конъюгат пероксидазный иммуноглобулиновый туляремийный - туляремийные иммуноглобулины, иммобилизованные с пероксидазой хрена - 1 амп. (0,1 мл);
- взвесь убитой культуры туляремийного микроба (положительный контроль) - взвесь убитой культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ с концентрацией 1,0x10⁹ м.к./мл - 1 амп. (1,0 мл);
- иммуноглобулины туляремийные - иммуноглобулины класса G, выделенные из сыворотки кроликов, иммунизированных антигенами штаммов *F. tularensis* 503/840, *F. tularensis* 543/6, *F. tularensis* Schu - 1 амп. (0,25 мл);
- ФСБ - сухая навеска [калий едкий (ГОСТ 24363-80) - 0,560 г; натрий хлористый (ГОСТ 4233-77) - 8,775 г; калий фосфорнокислый однозамещенный (ГОСТ 4198-75) - 1,360 г] - 1 фл. (10,695 г);
- БСА - сухая навеска (ТУ 6-09-10-342-75) - 1 фл. (0,025 г);
- ЦБ - сухая навеска [кислота лимонная (ГОСТ 908-79) - 0,115 г; - 0,560 г, натрий фосфорнокислый однозамещенный (ГОСТ 245-76) - 0,181 г] - 1 фл. (0,256 г);
- ОФД - сухая навеска (ТУ 6-09-05-1291-84) - 2 фл. (0,012 г);
- стоп-реагент - [серная кислота (ГОСТ 4204-79), 4 N раствор], готовый для использования - 1 фл. (11 мл);
- твин-20 (фирма Merck, Германия, кат. № 822184) - 1 фл. (0,5 мл);
- гидроперит - таблетка в заводской упаковке - 1 таблетка;
- планшет для иммуноферментного анализа однократного применения (ТУ 64-2-375-86) - 2 шт.;
- скарификатор дисковый ампульный керамический СДАК 19-01.

Z

Приказом от 12 декабря 2013 года № 2235/Пр-13 в замене допущено к обращению на территории Российской Федерации

Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

0005008

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 133834

**РАДИОУПРАВЛЯЕМАЯ САМОХОДНАЯ И ПЛАВАЮЩАЯ
ПОРТАТИВНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО,
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА
ОБЪЕКТОВ ВОДНОЙ СРЕДЫ**

Патентообладатель(и): *Федеральное казённое учреждение
здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2013122182

Приоритет полезной модели 14 мая 2013 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре полезных
моделей Российской Федерации 27 октября 2013 г.

Срок действия патента истекает 14 мая 2023 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Б.Л. Симонов



Автор(ы): *Кальной Сергей Михайлович (RU), Зайцев Александр Алексеевич (RU), Мезенцев Владимир Матвеевич (RU), Жарникова Татьяна Владимировна (RU), Бондаренко Андрей Иванович (RU), Самарина Ирина Владимировна (RU), Остапович Владислав Владимирович (RU), Гаркуша Юлия Юрьевна (RU), Ефременко Дмитрий Витальевич (RU), Гнусарева Ольга Александровна (RU), Харченко Татьяна Васильевна (RU)*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 125976

**УНИВЕРСАЛЬНАЯ УКЛАДКА ДЛЯ ЗАБОРА И
ТРАНСПОРТИРОВКИ МАТЕРИАЛА ОТ ЛЮДЕЙ,
ЖИВОТНЫХ И ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ОСОБО ОПАСНЫЕ
ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ**

Патентообладатель(ли): *Федеральное казённое учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (РУ)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2012127535

Приоритет полезной модели **02 июля 2012 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации **20 марта 2013 г.**

Срок действия патента истекает **02 июля 2022 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Б.П. Симонов



Автор(ы): *Кальной Сергей Михайлович (RU), Лямкин Геннадий Иванович (RU), Головнёва Светлана Ивановна (RU), Русанова Диана Владимировна (RU), Катунина Людмила Семёновна (RU), Гаркуша Юлия Юрьевна (RU)*

ПО

(1

С

С

Г

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

С

RU 125976 U1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2535070

**СПОСОБ ЭЛЮЦИИ ПАТОГЕНА С
ИММОБИЛИЗОВАННОЙ МАГНИТНОЙ МАТРИЦЫ**

Патентообладатель(и): *Федеральное казённое учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2013132033

Приоритет изобретения **10 июля 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **08 октября 2014 г.**

Срок действия патента истекает **10 июля 2033 г.**

*Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Л.Л. Кирий



Автор(ы): *Гаркуша Юлия Юрьевна (RU), Жарникова Ирина Викторовна (RU), Тюменцева Ирина Степановна (RU), Афанасьев Евгений Николаевич (RU), Курчева Светлана Александровна (RU), Старцева Ольга Леонидовна (RU), Жданова Елена Владимировна (RU), Семирчева Анастасия Александровна (RU)*

RU 2535070 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2549971

**СПОСОБ КОНСЕРВАЦИИ ИММУНОПЕРОКСИДАЗНОГО
КОНЬЮГАТА**

Патентообладатель(и): *Федеральное казённое учреждение
здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014126682

Приоритет изобретения 01 июля 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 03 апреля 2015 г.

Срок действия патента истекает 01 июля 2034 г.

*Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Л.Л. Кирий



Автор(ы): *Зайцев Александр Алексеевич (RU), Гусарева Ольга Александровна (RU), Курчева Светлана Александровна (RU), Гаркуша Юлия Юрьевна (RU), Тюменцева Ирина Степановна (RU), Рыбалко Татьяна Ивановна (RU), Куличенко Александр Николаевич (RU)*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2652231

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА
МАГНИТНОГО СОРБЕНТА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ
МЕДИЦИНСКИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ**

Патентообладатель: *Федеральное казённое учреждение
здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017103540

Приоритет изобретения 02 февраля 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 25 апреля 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 02 февраля 2037 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Назиев Г.П. Назиев

Авторы: Тюменцева Ирина Степановна (RU), Кальной Сергей Михайлович (RU), Афанасьев Евгений Николаевич (RU), Куличенко Александр Николаевич (RU), Курчева Светлана Александровна (RU), Старцева Ольга Леонидовна (RU), Жданова Елена Владимировна (RU), Гаркуша Юлия Юрьевна (RU)