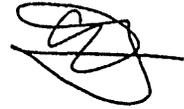


9 $\frac{05 - 10}{829 - 5}$

На правах рукописи



ЕФРЕМЕНКО Дмитрий Витальевич

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭКСПРЕССНЫХ
МЕТОДОВ ИНДИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ
ТУБЕРКУЛЕЗА**

03.00.23 – биотехнология

03.00.07 - микробиология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Ставрополь – 2005

Работа выполнена в Ставропольском научно - исследовательском противочумном институте

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Жарникова Ирина Викторовна

Научный консультант: доктор медицинских наук,
Будыка Дмитрий Александрович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Ивашев Михаил Николаевич
кандидат медицинских наук, доцент
Казнев Азрет Хусеевич

Ведущая организация: научно – исследовательский институт
микробиологии МО РФ, г. Киров

Защита диссертации состоится 22 ноября 2005 года в 10 часов на заседании регионального диссертационного совета ДМ 212.256.04 при Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина д. 1, корпус 2, аудитория 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского государственного университета по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1, корпус 1.

Автореферат разослан 15 октября 2005 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.И. Джандарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Анализ сложившейся эпидемиологической ситуации показывает, что заболеваемость туберкулезом в нашей стране носит характер эпидемии (Онищенко Г.Г., 2002; Пунга В.В., Капков Л.П., 1999). В России при диагностике туберкулеза большое внимание уделяется культуральным методам, за рубежом – микроскопии мазка. Но оба эти метода имеют существенные недостатки. В связи с этим, актуальным является разработка диагностических препаратов для выявления микобактерий туберкулеза (МТБ) и методов исследований, обладающих высокой специфической активностью, экспрессностью и информативностью.

Цель исследования: совершенствование биотехнологий иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики микобактерий туберкулеза.

Основные задачи исследования:

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

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

Разработан и применён аффинный магносорбент при проведении иммуносорбции гетерологичных антител из иммунных туберкулезных сывороток; позво-

1/5 2 -

К

ляющий получать специфичный препарат с сохранением его первоначальной активности, ускорять и упрощать процесс сорбции.

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

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

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

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

Разработаны научно-методические приёмы по получению полноценного антигенного материала из бакмасс микобактерий, высокоактивных иммунных сывороток, удалению из них перекрёстно реагирующих антител с помощью магнитных сорбентов. Оптимизация параметров иммобилизации антител обеспечила конструирование высокоактивных и специфических диагностических препаратов (иммуноферментных, суспензионных латексных и алюмосиликатных для реакции агглютинации, магнимоносорбентных).

Разработанные методические подходы по ковалентной фиксации на поверхности мембраны липосом ферментов и иммуноглобулинов позволили повысить

стабильность и увеличить срок годности диагностической системы без потери активности с сохранением каталитических свойств.

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

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

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

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

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

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Научно-методические подходы к получению высококачественного биологического сырья (антигенов и антител) для производства диагностических туберкулёзных препаратов. Получены водорастворимые антигены микобактерий, содержащие полный набор высокоэффективных антигенных комплексов с высокой активностью (1:32-1:64 в реакции иммунодиффузии (РИД)). Подобрана производственная схема для получения иммунных сывороток с высокими титрами антител, основанная на оптимальной комбинации комплекса специфических антигенов и иммуномодуляторов.
2. Методические приёмы конструирования и применения аффинных сорбентов с магнитными свойствами при проведении иммуносорбции неспецифических антител из иммунных туберкулёзных сывороток. Разработанные сорбенты с иммобилизованными гетерологичными антигенами и метод сорбции позволили за один этап получить не только высокоспецифичную сыворотку, но и сохранить её первоначальную серологическую активность.
3. Научно-методические основы изготовления липосомально - иммунопероксидазного конъюгата для выявления антигена туберкулёза иммуноферментным методом. Иммобилизованные на мембране липосом фермент и туберкулёзные иммуноглобулины повышают свою стабильность, что приводит к увеличению срока годности диагностической системы.
4. Биотехнология производства суспензионных латексных и алюмосиликатных диагностикумов, обеспечивающая высокую эффективность обнаружения микобактерий туберкулёза в экспериментальных и клинических условиях. Разработанные препараты по чувствительности аналогичны традиционным методам, но превосходят их по простоте изготовления и экспрессности (постановка и учёт результатов реакции с алюмосиликатным диагностикумом 1-3 мин).
5. Научно-методические основы биотехнологии изготовления твёрдофазных микрогранулированных аффинных магноиммуносорбентов для избирательного концентрирования микобактерий и их использования в экспрессных методах (ИФА, КИФА). Разработанные препараты позволяют повысить чувствительность более чем в 1000 раз при увеличении вероятности выявления микобактерий за счёт селективного концентрирования антигена на антителе, находящемся на твёрдой матрице.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская микробиология XXI века» (Саратов, 28-30 сентября 2004); 1-й Всероссийской конференции «Медицинские иммунобиологические препараты для профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций» (Москва, 10-11 октября, 2004); региональном обществе эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Ставрополь, 17 февраля 2005); научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпид.надзора за природно-очаговыми и особо опасными инфекциями в регионе Северного Кавказа» (Ставрополь, 14 – 16 апреля 2005), на VI Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Санитарная охрана территорий государств участников содружества независимых государств: проблемы биологической безопасности и противодействия биотерроризму в современных условиях» (Волгоград, 2005).

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

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. В работе использовано 27 штаммов микроорганизмов II, III и IV групп патогенности родов *Micobacterium*, *Brucella*, *Nocardia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria*.

В опытах были использованы: 34 кролика обоего пола породы «Шиншилла», 30 беспородных белых мышей, 15 морских свинок.

Для работы применялся материал (моча и мокрота) от больных туберкулезом лёгких, почек, мужских половых органов, глаз и т.д., полученный из Красового клинического противотуберкулезного диспансера (ККПТД).

Водорастворимые антигены изолировали комплексным методом: водно-солевой экстракцией и дезинтеграцией микроорганизмов (Афанасьев Е.Н., Таран И.Ф., Тюменцева И.С., 1986).

Иммунизацию осуществляли по схеме, разработанной И.С.Тюменцевой (1994) и Е.Н.Афанасьевым (2000). Контроль титра антител в сыворотках определяли в непрямой реакции иммунофлюоресценции по Т.Н.Weller, А.Н.Coons (1954). Микроскопию препаратов осуществляли в люминесцентном микроскопе серии "Люмам". Анализ антигенного состава микроорганизмов и качества сывороток проводили в реакции иммунодиффузии в 1 % агаровом геле (Difco, USA) по О. Ouchterlony (1949).

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

Конъюгацию иммуноглобулинов, фракционированных каприловой кислотой (Steibuch G., Andran R., 1969), с ФИТЦ ($C_{21}H_{41}NO_5S$) фирмы «Sigma» проводили по Х.Шторц (Stortz, 1987). Прямой метод окраски препаратов осуществляли по А.Н.Coons, М.Н. Kaplan (1950). Очистку конъюгатов проводили методом восходящей хроматографии на бумаге (Носков Ф.С., 1985).

Фосфолипиды, из которых конструировали липосомы, выделяли из мозга крупного рогатого скота (к.р.с.) и свиней. Состав липидов определяли по методике, описанной в книге М.Кейтс (1975), с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол». Формирование липосом и определение их размеров контролировали на электронном микроскопе Hol (Япония) JEM – 100SX.

Иммунопероксидазные конъюгаты получали методом периодатного окисления по Р.К.Nakane, А.Kawaoi (1974) в модификации Е.А.Ткаченко с соавт. (1982). Рабочий титр и специфическую активность определяли по методике М.Clark и А. Adams (1977) в "сэндвич"-варианте ИФА. Очистку конъюгатов проводили на хроматографической колонке фирмы LKB, используя сефадекс G-100.

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

Микроструктуру поверхности магносорбентов (МС) исследовали по методу, описанному в работе Д.Фрайфелдера (1980). Удельная поверхность МС определялась по методу А.А.Клячко-Гурвича (1961), суммарный объем и радиус пор МС - по методу Н.В.Кельцева (1984).

Лнофилизацию препаратов проводили в камере LZ-9с (Чехословакия). Готовые препараты разливали в ампулы, замораживали в низкотемпературном столе LZ-280/75 при температуре минус $(45 \pm 5) ^\circ\text{C}$ не менее 18 ч и высушивали в сушильной камере под вакуумом.

Математическую обработку результатов экспериментов проводили на компьютере (программа EXCEL). Для подтверждения воспроизводимости и достоверности результатов применяли статистические методы (Тамбовцев Е.П., Ахметкалиев С.Г., Пятницкий Н.П., 1969; Скуч Д., Уэст Д., 1979).

Результаты исследований

Оптимизация способов получения высокоактивного специфического биологического сырья (антигенов (Аг) и антител (АТ))

Водорастворимые туберкулёзные антигены изолировали комплексным методом: водно-солевой экстракцией, осаждением белковых фракций сульфатом аммония, механической и ультразвуковой дезинтеграцией. Выход белковых фракций составил около 20 мг/мл. Использование данного метода позволило получить наиболее полный антигенный комплекс из бакмасс микобактерий туберкулёза с активностью в РИД 1:32-1:64.

В дальнейшем водорастворимый туберкулёзный антиген использовали для иммунизации животных с применением в качестве иммунокорректоров тималина, циклофосфана и феракрила.

При контроле специфичности туберкулёзных сывороток установлено, что наблюдаются перекрёстные реакции с *B. abortus 19*, *Nocardia brasiliensis*, *M. intracellulare # 23*, *M. kansasii* Yoss. Из данных культур получали бакмассы, выделяли водорастворимые антигены и использовали в качестве лигандов при получении аффинных сорбентов. При конструировании аффинного сорбента с магнитными свойствами в качестве матрицы использовали оксид железа и алюмосиликат. Рекомендованы следующие оптимальные условия получения МС: соотношение

компонентов синтеза 2:2:1, соответственно Fe_2O_3 , декстран, алюмосиликат; время гелеобразования -2 час, значение pH гелеобразования -7,0.

Для придания магносорбенту аффинных свойств на его поверхность, активированную натрием перхлората, иммобилизовали белковые лиганды (рис.1) - водорастворимые антигены, полученные из гетерогенных штаммов микроорганизмов в равных соотношениях. Оптимальными факторами, способствующими получению МИС, являются: время иммобилизации 2 часа при значении pH раствора водорастворимых антигенов 6-7 и температуры в интервале (24 - 37) °С.

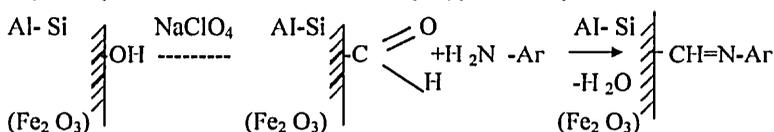


Рисунок 1. Схема получения МИС на декстраноалюмосиликагеле

Полученные МИС характеризуются стандартностью структурных характеристик (3 года срок наблюдения), механической, химической и микробиологической устойчивостью.

При сорбции иммунной сыворотки использование данного магнoиммунносорбента позволило не только освободить препарат от неспецифических антител на одном этапе, но и сохранить первоначальную активность нативных сывороток. Магнитные свойства МИС значительно упростили процесс отделения его от жидкой фазы в магнитном поле и исключили процесс длительного центрифугирования. Сорбент можно регенерировать и многократно использовать.

Разработка биотехнологии липосомально-иммунопероксидазного конъюгата

Последующие процессы получения иммунобиологических препаратов относятся к стадиям, предусматривающим конъюгацию лиганда с ферментом (иммуноферментные препараты для ИФА). В результате исследований получены высокоактивные (до 1:800), специфичные (отсутствуют перекрёстные реакции с гетерологичными штаммами) иммуноферментные конъюгаты, благодаря проведённой сорбции гетерологичных антител из сыворотки крови, но срок их годности ограничен и составляет 1 год при надлежащем хранении. Перед нами поставлена задача, иммобилизовать фермент-пероксидазу хрена в носитель и присоединить лиганд – туберкулёзные иммуноглобулины. Наиболее подходящей матрицей для фермента-пероксидазы хрена и поставленной задачи оказались липосомы. Липосомы получали методом «выпаривания в обращённой фазе», используя в качестве

сырья хлороформные растворы фосфолипидов и ганглиозидов, выделенных из мозга к.р.с. и свиньи, в соотношении 20:1.

Для исключения негативного влияния ультразвука на липиды смесь перемешивали до образования стойкой эмульсии типа «вода в масле», упаривали в вакууме и добавляли 5 мл 0,01 М ФСБ рН 7,2, интенсивно встряхивали до образования гомогенной структуры липосом. На электронном микроскопе были обнаружены липосомы со средним размером 150-300 нм. Полученные липосомы были использованы в качестве «твёрдой» фазы при получении иммуоферментного препарата для диагностики МТБ. Ковалентно фиксируясь на поверхности мембраны липосом, фермент и иммуноглобулин снижают способность к конформационным изменениям структуры своих молекул под воздействием факторов внешней среды, что способствует повышению стабильности и увеличению срока годности диагностической системы.

Затем на наружной мембране липосом последовательно фиксировали пероксидазу хрена и туберкулёзные Ig G. Ковалентное связывание липосом с ферментом достигалось за счёт части активированных групп пероксидазы и аминок групп, находящихся в молекулах ганглиозидов, встроенных в мембрану липосом при их приготовлении. Несвязавшуюся пероксидазу удаляли хроматографически на колонке с сефадексом G-100. Фиксацию Ig G на поверхности липосом с иммобилизированной пероксидазой хрена проводили при температуре $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$, помещивая на шуттеле в течение 1-24 ч, и стабилизировали боргидридом. При этом Ig G за счёт свободных аминок групп связывались с оставшимися свободными альдегидными группами углеводной части пероксидазы. Для очистки конъюгата от несвязавшихся Ig G проводили гель-хроматографию, используя сефадекс G-100.

Наиболее высокочувствительный липосомальный иммуоферментный диагностикум был получен при концентрации белка иммуноглобулинов 5 мг/мл и времени их инкубации с липосомальным ферментным конъюгатом 2 ч.

Для увеличения срока годности препарат замораживали и лиофилизировали в течение (18 ± 2) ч до конечной температуры $25 ^\circ\text{C}$. В готовом препарате контролировали физико-химические и иммунологические свойства после лиофилизации и в процессе хранения в течение 2 лет (срок наблюдения). Чувствительность конъюгата в ИФА с гомологичными штаммами - 1×10^5 - 1×10^4 м.к./мл, при отсутствии перекрёстных реакций с гетерологичными штаммами.

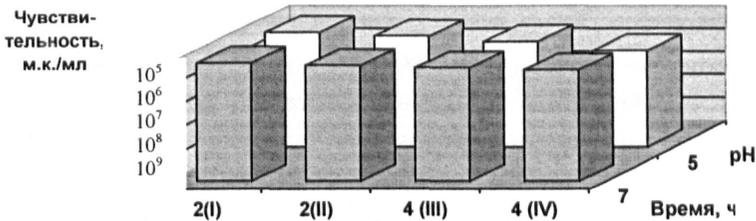
Таким образом, в результате проведённых исследований разработана биотехнология изготовления иммобилизованного ферментного препарата, значительно увеличивающая его стабильность.

Оптимизация параметров получения туберкулёзных суспензионных диагностикумов

Нами проведена научно-технологическая разработка латексных (полиакролеиновых) диагностикумов. Наличие альдегидных групп на поверхности латексных частиц позволяет легко образовывать ковалентную связь с аминокруппами белков. Были отработаны оптимальные условия их изготовления: использование иммуноглобулинов для сенсибилизации только из адсорбированных туберкулёзных сывороток; оптимальная нагрузка иммуноглобулинов - 400 мкг/мл, время сенсибилизации 6 часов, температура - 50 °С, pH раствора при сенсибилизации и постановке анализа - $7,2 \pm 0,1$.

Проведены исследования по разработке диагностикумов суспензионных алюмосиликатных иммуноглобулиновых для реакции суспензионной агглютинации (РСА) на стекле методом формирования пористой структуры кремнезёмной матрицы, обладающей высокой адсорбционной активностью. Получены положительные результаты при использовании алюмосиликата с аураминем в качестве красителя. Установлено, что для оптимальной иммобилизации достаточной является концентрация белка 1,5 мг/мл, время иммобилизации - 2 час при температуре (26 ± 4) °С, pH - 7,0 (рис.2).

Чувствительность сконструированных диагностикумов суспензионных в РСА на стекле составила $7,8 \times 10^5 - 1,56 \times 10^6$ м.к./мл, что соответствует чувствительности диагностикумов латексных в реакции агглютинации латекса. При этом учет результатов РСА на стекле возможен через 1-3 мин, а окончательный результат реакции агглютинации латекса (РАЛ) (макрометод)- через 16- 18 ч. При проведении статистической обработки по методу Е.П. Тамбовцева с соавт.(1969), в серии опытов титр РАЛ \bar{t} равен $5,2 \times 10^5$ м.к./мл (+14,1 %; -12,3 %), титр РСА - \bar{t} равен $0,92 \times 10^6$ м.к./мл (+7,2 %; -6,7 %).



I, III – температура 24 °С, II, IV - температура 45°С

Рисунок 2. Влияние температурного, временного факторов и pH на чувствительность суспензионного диагностикума при его изготовлении

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

Сочетанные методы детекции микобактерий туберкулёза с магнимоносорбентами

В последнее время актуальным является разработка и применение магносорбентов, благодаря которым упрощаются, ускоряются все этапы исследований при высокой чувствительности препаратов и возможности автоматизации учёта реакций.

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

Нами разработана биотехнология органокремнезёмного магносорбента с использованием окиси железа (III) и алюмосиликата. Модифицирование поверхности осуществляли в присутствии полимера - декстрана. На основе проведенных исследований рекомендованы следующие оптимальные условия получения алюмосиликатных МС: соотношение компонентов синтеза 2:2:1, соответственно Fe₂O₃, декстран и алюмосиликат, при времени гелеобразования - 2 ч и значении pH гелеобразования - 7,0.

Далее проводили иммобилизацию магносорбентов туберкулёзными иммуноглобулинами. В качестве сшивающего агента использовано поверхностно-активное вещество (ПАВ)-вторичный алкилсульфат натрия, при этом прочность связи антител с магносорбентом повышается за счёт создания дополнительных связей, которые образуются между активными группами белка, полиглюкина (декстрана) и вторичного алкилсульфата натрия. Оптимальной для полного насыщения

антителами сорбента в объеме 0,4 мл является концентрация белка иммуноглобулинов 2,0 мг/мл.

Эффективными факторами, способствующими получению активного МИС, являются: время иммобилизации 2 часа при значении рН раствора иммуноглобулинов 6,0-7,0 и температуры в интервале (22 ± 4) °С и 37 °С. На чистых культурах и модельных опытах получены положительные результаты при наличии в объеме пробы $0,5 \cdot 10^2$ м.к. и выше. Магноиммуносорбенты характеризуются стандартностью структурных характеристик, механической, химической и микробиологической устойчивостью.

При использовании традиционного иммуноферментного метода имеются следующие недостатки, которые отсутствуют в предложенной тест-системе в связи с использованием магнитоуправляемого магносорбента с включенными антителами: 1) для исследования берётся ограниченный (0,2) мл объём исследуемого материала (т.к. объём лунки – 0,4 мл), в то время как при использовании магноиммуносорбента объём неограничен; 2) время постановки иммуноферментного анализа около 20 часов, включая 18-ти часовую сенсibilизацию, а время проведения анализа с магноиммуносорбентами – 1-1,5 ч; 3) чувствительность иммуноферментного метода $5 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5$ м.к./мл, а чувствительность представленной тест-системы составляет $1 \cdot 10^2$ м.к./мл, при отсутствии перекрёстных реакций с гетерологичными штаммами. При этом отпадает необходимость использования сенсibilизированных микроплашкет.

В последние годы при выявлении микобактерий туберкулёза широко применяют люминесцентную микроскопию. Наиболее перспективными являются методы диагностики, основанные на образовании комплекса антиген-антитело, особенно в связи с возможностью использования в иммунофлуоресценции твёрдых носителей (Стоев К.Г. с соавт., 1981; Подзолкова Г.Г. с соавт., 1989 и т.д.). Нами апробирован данный метод с использованием магноиммуносорбентов для обнаружения антигенов возбудителя туберкулёза и определены оптимальные параметры постановки количественного иммунофлуоресцентного анализа (КИФА), чувствительность и специфичность метода.

На чистых культурах и в модельных опытах на воде, контаминированной различными концентрациями туберкулёзных микроорганизмов, получены положительные результаты при наличии в объеме пробы $0,5 \cdot 10^2$ м.к. и выше, при от-

сутствии перекрёстных реакций с гетерологичными штаммами. Прибором, регистрирующим уровень свечения магнитных гранул, служил люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ Р-8, оборудованный фотометрической насадкой типа ФМЭЛ-14. К насадке подсоединяли источник тока УБПВ-1 и вольтметр цифровой универсальный типа В7-76. С помощью КИФА появилась возможность учитывать реакцию не только визуально, но и инструментально (в условных единицах по показаниям вольтметра). Схема проведения экспресс-анализов при выявлении антигенов МТБ с применением МИС представлена на рис.3.

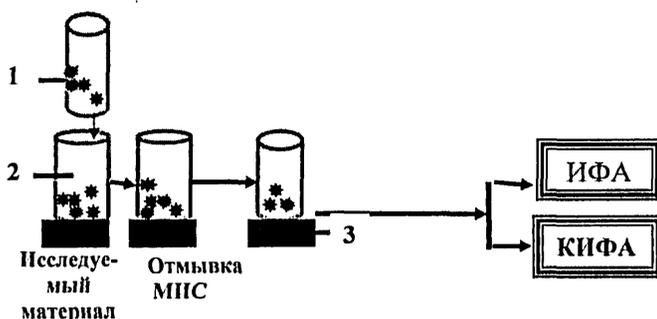


Рисунок 3. Схема проведения экспресс-анализов при выявлении антигенов МТБ с применением МИС

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

Нами приготовлено по 5 серий тест-систем магнимоносорбентных для диагностики возбудителя туберкулёза в ИФА и КИФА, в которые входят туберкулёзные магнимоносорбенты-10 % взвесь, 3 ампл. по 2 мл; положительный контроль-обеззараженные клетки микобактерий туберкулёза, 1×10^9 м.к./мл, 1 ампл. -1 мл; иммуноглобулины туберкулёзные флуоресцирующие - рабочее разведение 1:16-1:64-1 ампл; липосомально-иммунопероксидазный конъюгат-1 ампл и все необходимые ингредиенты для постановки ИФА.

При проведении статистической обработки по методу Е.П. Тамбовцева с соавт. (1969) в серии опытов титр ИФА \bar{t} равен $0,8 \times 10^2$ м.к./мл (+8,7 %; -8,0 %), КИФА $0,82 \times 10^2$ м.к./мл (+7,9 %; -7,3 %).

Установлено, что туберкулёзные магнoиммунoсoрбeнты в жидкoм виде стабильны без пoтeри физикo-химических и иммунологических свойств, без микрoбиoлогического прорoста в течение 3 лет (срoк наблюдения).

Изучение диагностической ценности разработанных диагностикумов и тест-систем для выявления антигена возбудителя туберкулеза

Разработанные диагностические препараты и тест-системы для выявления микобактерий туберкулёза испытаны в лабораторных и клинических условиях.

Целью наших исследований являлось максимально возможное лабораторное выявление МТБ у наиболее эпидемически опасной категории больных. Сбор, хранение, транспортировку и работу с диагностическим материалом (моча, мокрота) проводили согласно приказу МЗ РФ № 109, приложение № 10 от 21.03.2003. Было исследовано 286 проб клинического материала (моча, мокрота) от больных различными формами туберкулёза из ККПТД, 12 проб материала от больных с нетуберкулёзными заболеваниями и 11 проб от здоровых людей, у которых исследовали мочу и мокроту. Тестирование микобактерий осуществлено методами: РАЛ, РСА, ИФА, ИФА и КИФА с МИС. Сравнительная характеристика методов представлена в табл. 1.

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

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

Отсутствие 100 % специфичности разработанных диагностических систем объясняется тем, что, хотя при их изготовлении использована туберкулёзная сыворотка, адсорбированная гетерологичными антигенами на твёрдом носителе, однако полного удаления из неё гетерологичных иммуноглобулинов, вероятно, не произошло, так как, род микобактерий составляют более 100 видов.

Таблица 1. Сравнение методов диагностики туберкулёза

№ п/п	Метод	Время детекции	Выявляемость	Литературный источник
1.	Туберкулинодиагностика	72 ч	67 %	Чугаев Ю.П. с соавт, 1996
2.	Культивирование МТБ	1-3 мес.	0,5-14 %	Клименко М.Т. с соавт, 1987
3.	Микроскопия (флуоресцентная с аураминном)	2,5 ч	14 %	Капок А.Н., 1995 Собственные данные
4.	РСА	5 мин	65 %	
5.	РАЛ	2 ч	66 %	
6.	ПФА	3 ч*	76 %	
7.	ПФА с МПС	1-1,5 ч	91 %	
8.	КПФА с МПС	1-1,5 ч	91 %	

*- без учёта 18 часовой сенсibilизации планшет

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

Результаты сравнительной характеристики традиционных и сочетанных экспресс-анализов и их технико-экономическое обоснование показывают явные преимущества применения селективного концентрирования микобактерий туберкулёза на магниммуносорбентах с последующим проведением экспресс-анализов (табл.2).

Таблица 2. Сравнительная характеристика традиционных и сочетанных экспресс-анализов и их технико-экономическое обоснование

Анализы	Активность м.к. мл	Срок годности твёрдой фазы	Кол. анализов	Время поста- новки, ч	Статьи затрат						Стоимость 10 анализов, руб
					Заработ- ная плата	Начисле- ния на зар- плату (35,8 %)	Сырьё и материалы	Обору- дование	Наклад- ные расхо- ды (90 %)		
ИФА	тра- диц.	5×10^{-4}	20 дн.	10	3**	135,8	48,62	45,0	19,2	223,76	472,38
	соче- тан.	1×10^2	3 г.*	10	1	78,6	28,14	42,0	19,2	151,15	319,09
РНФ	тра- диц.	5×10^{-4}	6 мес	10	2	109,2	39,09	28,1	21,3	177,92	375,61
КИФА	соче- тан.	1×10^2	3 г.*	10	1	78,6	28,14	19,9	24,8	136,29	287,73

Примечание: * срок наблюдения

** время постановки традиционных анализов ИФА без учёта 18 часовой сенсебилизации планшет.

ВЫВОДЫ

1. Сочетанное использование водно-солевой экстракции, механической и ультразвуковой дезинтеграции позволило выделять из обеззараженных ацетоном микробактерий туберкулёза полноценные антигенные комплексы с серологической активностью 1:32-1:64 в реакции иммунодиффузии с туберкулёзной сывороткой. Данная биотехнология оказалась пригодной для изолирования антигенов из близкородственных возбудителю туберкулёза в серологическом отношении микроорганизмов.
2. При получении высокоактивных туберкулёзных иммунных сывороток для иммунизации кроликов применяли выделенные антигенные комплексы с иммуномодуляторами феракрилом, тималином и циклофосфаном. Специфическая активность полученных сывороток в непрямой реакции иммунофлуоресценции достигала 1:400–1:600, а в реакции иммунодиффузии – 1:32-1:64.
3. Удаление из туберкулёзных иммунных сывороток перекрёстно реагирующих антител с помощью магнитных сорбентов с ковалентно фиксированными на их

поверхности антигенами гетерологичных штаммов обеспечило получение сырья, пригодного для конструирования различных диагностических препаратов.

4. Разработанная биотехнология изготовления липосомальных туберкулёзных иммунопероксидазных конъюгатов обеспечила получение высокочувствительного, специфического диагностикума, отличающегося повышенной стабильностью при хранении по сравнению с традиционным иммунопероксидажным конъюгатом.

5. Впервые осуществлена научная разработка биотехнологии производства серии высокоспецифических диагностических препаратов и иммобилизованных систем для выявления возбудителя туберкулёза и его антигенов в искусственно контаминированных пробах и в клиническом материале от больных (моча, мокрота).

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

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Патент РФ № 2192265 7А 61 К 35/30. Способ получения комплекса фосфолипидов/ Ефременко В.И., Оверченко В.В., Мисетова Е.Н., Савельева И.В., Таран Т.В., Кузякова Л.М., Ефременко Д.В.-Заявка № 2000109191; Заявлено 12.04.2000; Зарегистрирован в Гос. реестре изобретений РФ 10.11.2002, Бюл. №31.
2. Патент РФ № 2195296 7А 61 К 35/30. Способ получения ганглиозидов/ Ефременко В.И., Оверченко В.В., Мисетова Е.Н., Жилченко Е.Б., Савельева И.В., Таран Т.В., Ефременко Д.В. - Заявка № 2000109192; Заявлено 12.04.2000; Зарегистрирован в Гос. реестре изобретений РФ 27.12.2002, Бюл. № 36.
3. Ефременко Д.В. Биотехнология приготовления диагностикума туберкулёзного магноиммуносорбентного// Сб. науч. трудов «Актуальные проблемы медицины», - Томск.- 2004. - Т.3.- № 2.- С. 318.
4. Ефременко Д.В. Получение аффинного сорбента для очистки туберкулёзной сыворотки от неспецифических иммуноглобулинов// Сб. науч. трудов «Актуальные проблемы медицины», - Томск.- 2004. - Т.3.- № 2.- С. 318.
5. Ефременко Д.В., Жарникова И.В., Головченко Т.В., Васильева А.А. Метод детекции инфекционных заболеваний с помощью магносорбентов// Мат. Всерос. научн.-практич. конф.- Саратов.- 2004.-С.90-91.
6. Ефременко Д.В., Жарникова И.В., Васильева А.А., Алиева Е.В. Разработка иммуносорбентного диагностикума для детекции возбудителей инфекционных заболеваний// Сб. науч. трудов, посвящ. 75-летию НИИ микробиол. МО РФ. - Киров.- 2004. - С.80-82.
7. Ефременко Д.В., Макрушникова А.И., Аванесова Ю.Ю. Модифицированный иммуноферментный анализ выявления микобактерий туберкулёза// Мат. I Всерос. конф. по вакцинологии «Медицинские иммунобиологические препараты для профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций». - Москва.- 2004.- С.26.
8. Ефременко Д.В. Биотехнологическое конструирование магноиммуносорбентов и получение тест-системы для выявления возбудителя туберкулёза с помощью иммуноферментного анализа. - Ставрополь.- 2005. - Деп. в ВИНТИ 26.05.2005, № 346 - В 2005. - 12 с.
9. Ефременко Д.В. Получение липосомально-иммунопероксидазного конъюгата для выявления туберкулёзных антигенов // Мат. VI Межгос. научн.-практич. конф. государств-участников СНГ «Санитарная охрана территорий государств участников содружества независимых государств: проблемы биологической безопасности и противодействия биотерроризму в современных условиях». - Волгоград. - 2005.- С.234-235.
10. Жарникова И.В., Ефременко Д.В., Юркина И.В. Конструирование диагностических тест-систем на основе иммобилизованных препаратов при выявлении особо опасных и других инфекций // Мат. VI Межгос. научн.-практич.конф. государств-участников СНГ «Санитарная охрана территорий государств участников содружества независимых государств: проблемы биологической безопасности и противодействия биотерроризму в современных условиях».- Волгоград. - 2005.- С.236-237.

Набрано и сверстано в Крайкомстате
Печать офсетная. Бумага офсетная. Формат 60x84/16
Физ. печ. л. –1,2 Усл. печ. л. – 1,16
Заказ 205 Тираж - 100
Отпечатано в цехе оперативной полиграфии
краевого комитета государственной статистики
г. Ставрополь, ул. Пушкина,4