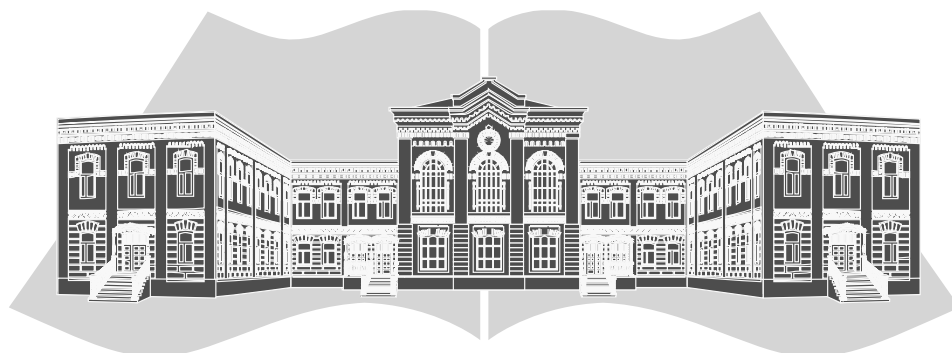


Министерство образования Московской области

Государственное образовательное учреждение  
высшего образования Московской области  
«Государственный гуманитарно-технологический университет»

Закрытое акционерное общество «ЭКОлаб»



**ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ  
В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ**

Учебное пособие

Орехово-Зуево  
2024

УДК [577.27+615.1](07)  
ББК 28.707.4я7 53.47я7 35.66я7 52.8  
И53

Печатается по решению Редакционно-издательского совета  
ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет»

**Рецензенты:**

*Долгов В.В.*, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последиplomного образования Минздрава РФ», профессор кафедры общей и медицинской биофизики Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва;

*Ротанов С.В.*, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ "Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии" Минздрава России.

**Авторы:**

*Марданлы С.Г., Симонов В.В., Гашенко Т.Ю., Морозова А.Г., Жданович А.И., Самосадова П.В., Шарикова М.С., Ильин И.И.*

И53 Иммунохимические методы в клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / С. Г. Марданлы, В. В. Симонов, Т. Ю. Гашенко и др. – Орехово-Зуево : ГГТУ, 2024. – 336 с.  
ISBN 978-5-87471-520-5

В пособии по предмету «Микробиология» приведены основные положения теоретической иммунохимии, имеющие значение при разработке и организации промышленного производства средств иммунохимической диагностики инфекционной и неинфекционной патологии человека, рассмотрены задачи иммунохимической диагностики, описаны иммунохимические реакции, используемые в клинической лабораторной диагностике, дан анализ методов регистрации и учета результатов диагностических исследований, рассмотрены особенности организации промышленного производства наборов реагентов для иммунохимических исследований в клинических лабораториях, приведены примеры технологических решений при производстве наиболее употребительных иммунохимических тестов.

УДК [577.27+615.1](07)  
ББК 28.707.4я7 53.47я7 35.66я7 52.8

© Коллектив авторов, 2024  
© ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», 2024  
© АО "Т8 Издательские Технологии", 2024  
© Оформление. ГГТУ, 2024

ISBN 978-5-87471-520-5

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. ОСНОВЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ ИММУНОХИМИИ .....	6
1.1. Понятие об иммунитете, иммунная система организма человека .....	6
1.2. Клеточные элементы иммунной системы.....	16
1.3. Гуморальные элементы системы иммунитета .....	19
1.4. Иммунный ответ .....	55
2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ИММУНОХИМИЯ –ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА .....	62
2.1. Задачи иммунохимической диагностики.....	62
2.2. Реакции взаимодействия антигенов и антител in vitro .....	69
2.3. Методы регистрации и учета результатов иммунодиагностических реакций.....	135
2.4. Материальное обеспечение иммунохимических исследований в клинических лабораториях .....	140
2.5. Особенности промышленного производства наборов реагентов для иммунохимических исследований в клинических лабораториях .....	149
2.5.1. Организация производства.....	150
2.5.2. Производство МИ <sub>ивд</sub> из крови животных-продуцентов .....	184
2.5.3. Производство наборов реагентов для постановки реакции.....	240
2.5.4. Производство наборов реагентов для реакции микропреципитации с кардиолипиновым антигеном.....	245
2.5.5. Производство наборов реагентов для иммунофлюоресцентного анализа .....	253
2.5.6. Производство наборов для иммуноферментного анализа .....	259
2.5.7. Производство наборов для иммунного блоттинга .....	294
2.5.8. Производство наборов для иммунохроматографического анализа.....	311
2.5.9. Технический контроль в производстве наборов реагентов.....	311
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	318
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	325
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	329

## ВВЕДЕНИЕ

Клиническая лабораторная диагностика (КЛД) – это комплекс методов исследования *in vitro*, результаты которых могут быть использованы при оценке состояния организма пациента, а по его результатам – при определении необходимости и характера лечебного или профилактического воздействия (т.е. для лечения патологических состояний или предупреждения их развития).

В этом комплексе не последнее место занимают *иммунохимические* методы исследования, называемые также *серологическими*, поскольку все они связаны, прежде всего с исследованиями сыворотки крови (*serum* по латыни).

Все эти методы основаны на фиксации и интерпретации результатов взаимодействия таких элементов *иммунной системы* (ИС) организма, как *антигены* и *антитела* к ним.

Целью иммунохимических (серологических) исследований является либо *серодиагностика*, т.е. диагностика патологического состояния по результатам оценки наличия в сыворотке крови специфических антител к конкретному патогену с помощью типичного для него антигена и, при необходимости, установлению содержания (концентрации или титров) этих антител, либо *сероидентификация*, т.е. идентификация патогена с помощью известного антитела к нему.

Поскольку и серодиагностика, и сероидентификация в настоящее время выполняются, как правило, с использованием готовых наборов реагентов, настоящее пособие разработано с целью дать студентам медицинских, фармакологических и биологических факультетов, собирающихся специализироваться на КЛД, а также работникам клинических лабораторий представление о том, как разрабатываются и производятся указанные наборы. А поскольку и разработка, и промышленное производство наборов реагентов для иммунохимических исследований предполагают обязательную информированность о принципах, на которых построены соответствующие методы исследования, в пособие включено

также краткое описание иммунной системы человеческого организма, характеристик ее элементов и способов их взаимодействия, а также методов регистрации и учета результатов этих взаимодействий.

Основное содержание пособия изложено в двух частях.

В первой части («Основы теоретической иммунохимии») дано краткое изложение основных положений иммунологии, имеющих отношение к иммунохимической диагностике.

Вторая часть («Практическая иммунохимия – иммунохимическая диагностика») посвящена более подробному описанию всех вариантов использования в диагностических целях внешних проявлений реакции «антиген-антитело», способов их регистрации и учета результатов этой реакции, условий, необходимых для проведения иммунохимических исследований в клинических лабораториях, и основных требований к организации промышленного производства наборов реагентов, используемых в КЛД. При описании технологических процессов производства различных диагностических препаратов в качестве примеров технологических решений использован производственный опыт ООО «ЭКОлаб».

Части разбиты на главы, которые, в свою очередь, могут быть разбиты на разделы, разделы – на подразделы, а подразделы – на пункты.

Ссылки на литературу, материалы которой использованы при составлении пособия, даются после названия глав, соответствующие ссылки даются также при заимствовании рисунков и таблиц и при необходимости специально выделить какие-то заимствованные положения.

# 1. ОСНОВЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ ИММУНОХИМИИ

## 1.1. Понятие об иммунитете, иммунная система организма человека

[3, 6, 7, 10, 11, 18, 22, 23, 36, 41, 52, 54, 58]

Исторически понятие «иммунитет» оказалось тесно связанным с понятием «инфекция», которое, в свою очередь, чаще всего интерпретируется как заражение патогенными микроорганизмами, т.е. практически отождествляется с понятием «инфекционная болезнь». Поэтому материалы медицинских публикаций, посвященных общим проблемам иммунитета, начиная с определения самого понятия, в подавляющем большинстве (в том числе и практически во всех использованных нами источниках) рассматривают это явление как *защиту макроорганизма от инфицирования или инвазирования*, т.е. от проникновения в его внутреннюю среду соответствующих микроорганизмов *и борьбу с состоявшейся инфекцией (инвазией)*. При этом в качестве макроорганизма, опять-таки традиционно, в большинстве случаев фигурируют организмы млекопитающих и, прежде всего, человека.

Если учесть, что разнообразнейшие микроорганизмы составляют обязательную и отнюдь не малую часть нашей среды обитания, то тезис *защиты от одного из ее факторов*, а тем более *борьбы с ним* явно не согласуется со столь же общепринятым представлением о всеобщей взаимосвязи природных явлений<sup>1</sup>. Поскольку человек и его среда обитания есть единое целое, речь должна идти не о *защите от микрофлоры внешней среды*, а о *приспособлении к ней*, и очевидным доказательством этого можно считать нашу *нормальную микрофлору*, взаимоотношения с которой в норме есть взаимное приспособление друг к другу нашего организма и его многочисленных сожителей.

---

<sup>1</sup> Здесь уместно вспомнить аналогичные положения, высказанные еще в середине прошлого века И.В.Давыдовским в его работах «Учение об инфекции» (1956) и «Проблемы причинности в медицине» (1962).

Но если, говоря о «защите», иметь в виду именно «приспособление», то, учитывая то, что большинство аспектов такого практического использования достижений науки «Иммунология», как иммунохимическая диагностика, по-прежнему относится к диагностике именно инфекций человека, в последующем изложении при описании иммунологических феноменов и их механизмов мы все же не будем уходить от общепринятых терминологических стереотипов, поскольку для чисто практических приложений соответствующих знаний некоторая односторонность их теоретической основы принципиального значения не имеет.

В соответствии со сказанным будем традиционно называть *иммунитет* способом защиты организма от всех антигенно чужеродных веществ как экзогенной, так и эндогенной природы.

Эта защита обеспечивается:

- элиминацией атипичных, стареющих, поврежденных и больных клеток организма;
- подавлением активности патогенных микроорганизмов при благоприятствовании полезной эндогенной флоре;
- обслуживанием репродукции на всех этапах, включая взаимоотношения матери и плода в процессе беременности;
- и самое главное – регуляцией клеточных функций в составе единой нейро-эндокринно-иммунной надсистемы, функционирующей на основе принципа комплементарных взаимодействий.

А биологический смысл подобной защиты – обеспечение генетической целостности особей вида в течение их индивидуальной жизни.

Перечисленные функции непосредственно выполняются *иммунной системой* (ИС) организма, т.е. системой контроля, обеспечивающей индивидуальность и целостность организма. В ИС (см. рис. 1) входят вилочковая железа (тимус), аналог сумки Фабрициуса (одни авторы предполагают, что это кожа, другие связывают его со стенкой толстой кишки) и костный мозг, которые считаются центральными органами ИС, а также селезенка, лимфатические узлы, миндалины и

рассеянные по всему организму многочисленные неинкапсулированные скопления лимфоцитов на разных стадиях их дифференцировки, которые считаются периферическими органами ИС.

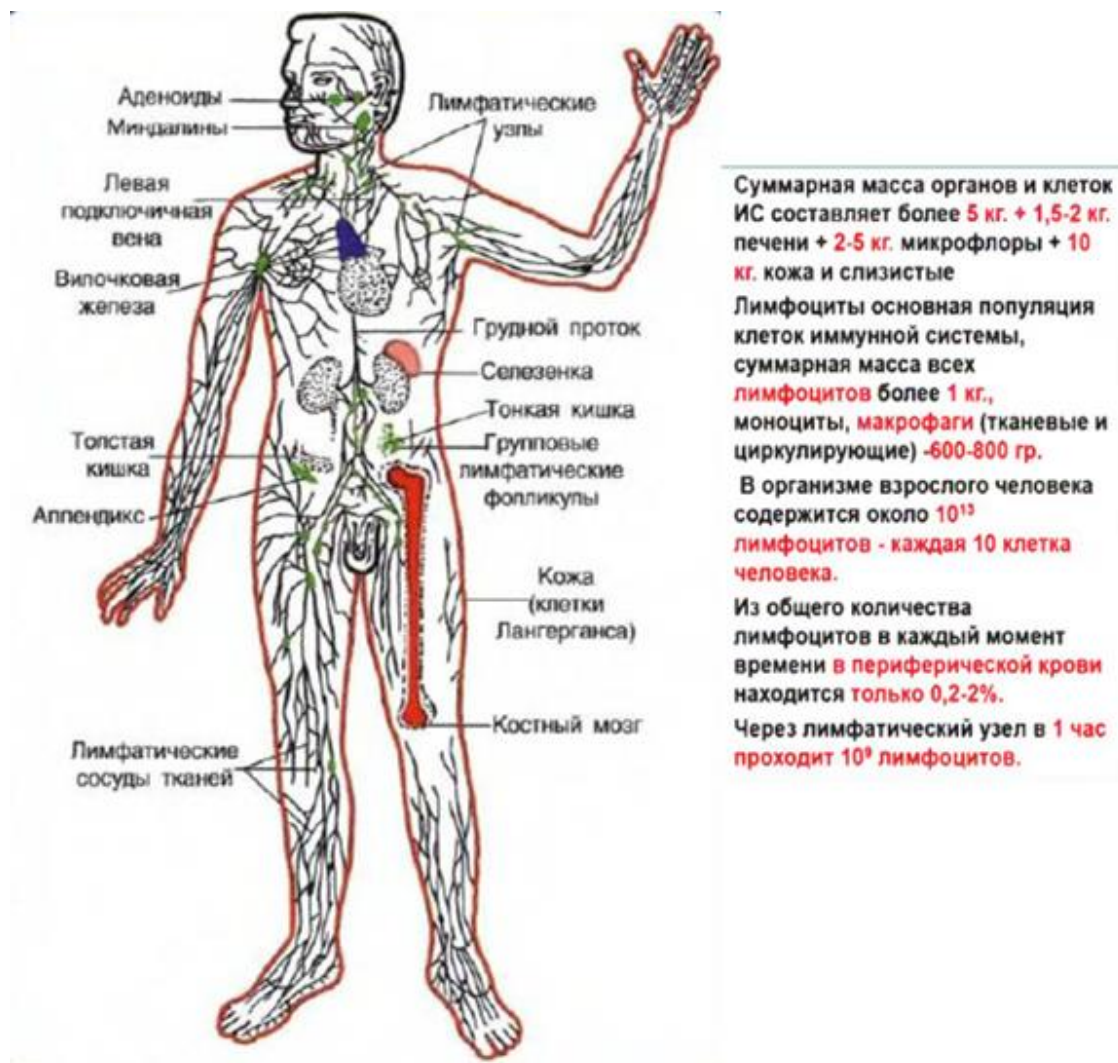


Рис. 1. ИС человека (по [3]).

В адаптированном для массового читателя изложении<sup>2</sup> ИС рассматривается как подсистема организма, существующая у позвоночных животных и объединяющая органы и ткани, которые защищают организм от заболеваний, идентифицируя (отличая от биомолекул собственных нормальных клеток) и уничтожая опухолевые клетки и патогены (любой микроорганизм, включая вирусы, бактерии и проч.), способные вызывать патологическое состояние. Ее конечной целью

<sup>2</sup> См. Иммунология для чайников. <https://a-v-efremov.narod.ru/immunity.html>



является уничтожение чужеродного агента. В ИС развитых организмов существует множество способов обнаружения и удаления чужеродных агентов, их совокупность называется иммунным ответом. ИС человека и других позвоночных представляет из себя комплекс органов и клеток, способных выполнять иммунологические функции. Организм животных, обладающих механизмами приобретённого иммунитета, производит множество разновидностей специфических иммунных клеток, каждая из которых отвечает за какой-то определённый антиген. Наличие большого количества разновидностей иммунных клеток необходимо для того, чтобы отражать атаки микроорганизмов, способных мутировать и изменять свой антигенный состав. Значительная часть этих клеток завершает свой жизненный цикл, так и не приняв участие в защите организма, например, не встретив подходящих антигенов. ИС защищает организм от инфекции в несколько этапов, при этом с каждым этапом повышается специфичность защиты. Самая простая линия защиты представляет собой физические барьеры (кожа, слизистые оболочки), которые предотвращают попадание инфекции — бактерий и вирусов — в организм. Если возбудитель проникает через эти барьеры, промежуточную неспецифическую реакцию на него осуществляет врождённая ИС. Врождённая ИС обнаруживается у всех растений и животных. На случай, когда возбудители успешно преодолевают воздействие врождённых иммунных механизмов, у позвоночных существует третий уровень защиты — приобретённая иммунная защита. Эта часть ИС адаптирует свою реакцию во время инфекционного процесса, чтобы улучшить распознавание чужеродного биологического материала. Такой улучшенный ответ сохраняется после уничтожения возбудителя в виде иммунологической памяти. Она позволяет механизмам приобретённого иммунитета развивать более быструю и более сильную реакцию при каждом появлении такого же возбудителя. Как врождённый, так и приобретённый иммунитет, зависят от способности ИС отличать свои молекулы от чужих. В иммунологии под своими молекулами понимают те компоненты организма, которые ИС способна отличить от чужеродных. Напротив, чужими называют молекулы, которые рас-

познаются как чужеродные. Распознаваемые молекулы называют антигенами, которые в настоящее время определяют как вещества, связываемые специфическими иммунными рецепторами системы приобретённого иммунитета.

Нужно сказать, что в специальной литературе описания ИС, ее функций и механизмов, которыми эти функции реализуются, отличаются от приведенного, по сути, только своей куда бóльшей детализацией, бóльшим числом специальных терминов и, соответственно, бóльшим объемом. И они, точно также, не дают четкого определения, что же такое *чужеродность*, т.е. то свойство, которое позволяет ИС определять и обезвреживать потенциально патогенные объекты, попавшие во внутреннюю среду организма или образовавшиеся в ней (см. также раздел 1.3.1). Поэтому многие определения, используемые в медицинских публикациях, по существу, мало отличаются от «определений» типа «антиген – это вещество, вызывающее образование антител» и «антитело – это вещество, образуемое в ответ на введение антигена».

ИС можно рассматривать как совокупность клеточных элементов (прежде всего лимфоцитов и макрофагов), часть которых входит в уже названные органы структуры, а часть (причем весьма значительная) составляет рециркулирующую популяцию клеток крови и лимфы. Кстати, кровь и лимфа также являются частью ИС, так как в них циркулируют клеточные элементы системы. Поскольку лимфоциты, их предшественники и потомки являются основным типом клеток, перечисленных выше органов ИС, эти органы иногда именуют *лимфоидными органами*.

Механизмы устойчивости организма к генетически чужеродной информации можно разделить на два основных феномена - *неспецифическую резистентность* или *наследственный (врождённый, видовой) иммунитет* и *приобретенный иммунитет*.

Основное различие между ними состоит в том, что приобретенный иммунитет высокоспецифичен в отношении каждого конкретного патогена. Кроме

того, повторная встреча с тем или иным патогеном, не меняя врожденного иммунитета, повышает уровень приобретенного – ИС как бы «запоминает» патоген, чтобы впоследствии предотвращать вызываемую им патологию.

*Наследственный иммунитет* (врожденный, видовой) обусловлен выработанным в процессе филогенеза генетически закрепленным отношением вида к данному антигену или микроорганизму; он связан с биологическими особенностями обеих взаимодействующих сторон и характером их взаимодействия.

Видовой иммунитет неспецифичен и его принято делить на *абсолютный* (например, невосприимчивость животных к возбудителю ВИЧ-инфекции человека, к вирусам бактерий) и *относительный* (например, появление чувствительности к столбнячному токсину у нечувствительных к нему лягушек при повышении температуры тела). Но, если говорить строго, любое выделение в Природе чего-то «абсолютного» есть всего лишь проявление неполноты наших знаний о выделяемом, и наследственный иммунитет любого вида к конкретному патогену, в принципе, может быть только относительным, хотя вполне допустимы случаи, когда фактическим отличием этой «относительности» от «абсолютности» вполне можно пренебречь ввиду ее несущественности.

К механизмам врожденного иммунитета следует отнести фагоцитирующие клетки – моноциты, макрофаги и полиморфноядерные нейтрофилы. Они способны связывать микроорганизмы на своей поверхности, а затем поглощать и уничтожать их. Эта функция основана на простых, неспецифических механизмах распознавания объектов, попадающих во внутреннюю среду.

*Приобретенный иммунитет* имеет две главные характеристики – *специфичность* и *иммунологическую память*.

*Специфичность* – это, если говорить упрощенно, способность элементов защиты взаимодействовать только с одним конкретным антигеном, точнее с одной конкретной *антигенной детерминантой* (см. раздел 1.3.1). Далее, приобретенный иммунитет *индуцибелен*, т.е. контакт организма с антигеном, к которому приобретен иммунитет, провоцирует нарастание и функциональное созревание специфического клона клеток, продуцирующих соответствующие антитела, и

усиленную продукцию этих антител. *Индукцибельность* приобретенного иммунитета – очевидное следствие того, что ИС иммунизированного организма способна сохранять *память* о первой встрече с соответствующим антигеном.

О приобретенном иммунитете говорят, имея в виду прежде всего устойчивость к инфекционной патологии, т. е. специфическую устойчивость к конкретным видам микроорганизмов, которая приобретается организмом в течение его жизни либо в ходе взаимодействия с возбудителями инфекций после естественного контакта с ними (*естественный приобретенный иммунитет*), либо после специальных профилактических мероприятий – иммунизации населения против конкретных возбудителей (*искусственный приобретенный иммунитет*). И тот, и другой делятся на *активный* и *пассивный приобретенный иммунитет*.

*Активный* достигается за счет взаимодействия организма с антигенами возбудителя в ходе или манифестной, или бессимптомной инфекции (в том числе при бытовых скрытых контактах с небольшими дозами микробных антигенов – так называемая бытовая иммунизация), а также при искусственном введении микробных антигенов во время вакцинации, *пассивный* – за счет попадания в организм уже готовых антител к этому возбудителю (передача антител плоду от матери, введение иммунных сывороток, пересадка клеток, вырабатывающих антитела).

Приобретенный иммунитет не передается по наследству.

Активный иммунитет может быть *гуморальным* (обусловлен антителами), *клеточным* (обусловлен иммунокомпетентными клетками) и *клеточно-гуморальным* (обусловлен и антителами, и иммунокомпетентными клетками). Различают также иммунитет *стерильный*, сохраняющийся в отсутствие микроорганизма, и *нестерильный*, который существует только при наличии возбудителя в организме.

Во всех реакциях приобретенного иммунитета ведущая роль принадлежит лимфоцитам, поскольку они специфически распознают конкретный патоген, где бы он ни находился, внутри или вне клеток, в тканевой жидкости или в крови.

Существуют различные типы лимфоцитов, но основными являются *T*-лимфоциты или *T*-клетки и *B*-лимфоциты или *B*-клетки (см. главу 1.2).

Нужно сказать, что, хотя деление иммунитета на врожденный и приобретенный общепринято, оно также достаточно условно, поскольку элементы этих составляющих иммунитета находятся в столь тесной связи и взаимозависимости (взаимообусловленности), что строгое (безусловное) деление их на два названных класса на деле невозможно, в принципе. Это наглядно проявляется уже во взаимодействии фагоцитов и лимфоцитов.

Масштабы таких взаимодействий весьма значительны. Например, определенные типы фагоцитирующих клеток способны после захвата антигенов представлять их *T*-лимфоцитам в форме, подходящей для распознавания. Этот процесс назван *представлением (презентацией)* антигена. Распознав антиген, *T*-лимфоциты, в свою очередь, выделяют растворимые факторы (цитокины), которые активируют фагоциты и вызывают разрушение фагоцитированных микробов. При взаимодействии другого характера фагоциты используют образующиеся антитела для собственного более эффективного распознавания возбудителей. В результате иммунный ответ на инфекцию чаще всего складывается из различных взаимосвязанных эффектов как врожденного, так и приобретенного иммунитета. На ранних стадиях инфекции доминируют механизмы врожденного иммунитета, но позднее лимфоциты и их производные – плазматические клетки начинают осуществлять специфический ответ, свойственный приобретенному иммунитету. При этом они «запоминают» патоген и, если впоследствии организм вновь встречается с ним, они «вспоминают» его и осуществляют более эффективный и быстрый иммунный ответ. *B*-лимфоциты выделяют антитела, взаимодействующие с патогенами (в частности, с патогенными микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности).

Если исходить из того, что главное назначение ИС – это обеспечение защиты организма от инфекций, вызванных патогенными микроорганизмами, и от развития и распространения злокачественных опухолей, то реакции, которые

непосредственно вызывают нейтрализацию указанных выше патогенных факторов, составляют в совокупности *эффекторные механизмы ИС*.

В их число, прежде всего, входят клетки, специализирующиеся на разрушении патогенов. Вторая важная группа эффекторных механизмов – это вовлечение в иммунный ответ с помощью продуктов ИС мощных воспалительных процессов, включая активацию и привлечение макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов и других сходных типов клеток. Третий эффекторный механизм иммунитета – это активация в результате взаимодействия антиген-антитело системы комплемента - системы белков, вызывающих образование медиаторов воспаления и способных обеспечить прямой лизис клеток-мишеней, несущих на себе антиген, в частности бактерий, вирусов и опухолевых клеток (см. главу 1.3).

В заключении этой главы можно так обобщить сведения об ИС, ориентируясь на положения, высказанные А.В. Воробьевым с соавт. [38], но заменив в них «защиту» на «приспособление» и «патогенные микробы» на «потенциальные патогены»:

- ИС эволюционно формировалась для приспособления макроорганизма к попаданию *in vivo* потенциальных патогенов

- В поддержании иммунитета принимают участие лимфоциты и фагоциты. Лимфоциты распознают антигены патогенов. Фагоциты поглощают и разрушают сами патогены.

- Иммунный ответ состоит из двух фаз. В ранней фазе происходит распознавание антигена специфически реагирующими лимфоцитами и их активация; в поздней (эффекторной) фазе эти лимфоциты осуществляют свою координирующую функцию в устранении источника чужеродных антигенов из организма.

- Специфичность и память - это две основные характеристики приобретенного иммунитета. На повторную встречу с тем же самым антигеном ИС отвечает более эффективно.

- Лимфоциты специализированы по функциям. В-клетки образуют антитела. Цитотоксические Т-лимфоциты уничтожают клетки, инфицированные ви-

русами. Хелперные *T*-лимфоциты координируют иммунный ответ путем контактных межклеточных взаимодействий и выделения в межклеточную среду цитокинов, которые, например, помогают *B*-клеткам в образовании антител.

- Антигены - это чужеродные для организма молекулы, распознаваемые рецепторами лимфоцитов. *B*-лимфоциты обычно распознают нерасщепленные молекулы антигена, тогда как *T*-лимфоциты чаще всего способны распознавать антигенные молекулы только в виде фрагментов на поверхности других клеток.

- Узнавание молекул антигена специфичными к нему лимфоцитами влечет за собой селективное размножение лимфоцитарных клонов; клональная экспансия сопровождается дифференциацией лимфоцитов на клетки-эффекторы и клетки иммунологической памяти.

- При функционировании ИС могут возникать нарушения, приводящие к иммунодефицитному состоянию или к гиперчувствительности, а также к аутоиммунным заболеваниям.

Но самое главное, нужно признать, что до сих пор остается справедливым мнение, высказанное почти сорок лет назад авторами капитального руководства по иммунологии [26], что при всех успехах этой науки мощные регуляторные процессы, участвующие в функционировании ИС, пока еще не вполне понятны.

\*\*\*

### *Контрольные вопросы*

- 1. Какова взаимосвязь понятий «инфекция» и «иммунитет»?*
- 2. Чем обеспечивается защитная функция иммунитета?*
- 3. Что такое иммунная система организма?*
- 4. Что такое наследственный и приобретенный иммунитет; их основные различия?*
- 5. Каковы главные характеристики приобретенного иммунитета?*
- 6. Виды приобретенного иммунитета?*

## 1.2. Клеточные элементы иммунной системы [23, 54, 58]

Клетки ИС – это лимфоциты, макрофаги (моноциты) и гранулоциты (нейтрофилы). Хотя они различаются морфологически, биохимически и функционально, их объединяет то, что все они происходят от стволовых клеток кроветворной ткани (см. рис 2), и все они так или иначе участвуют в иммунном ответе макроорганизма. До рождения главным органом кроветворения является печень, а после рождения эти функции целиком переходят к костному мозгу.

Как уже говорилось, основным клеточным элементом, ответственным за специфическую иммунореактивность ИС, являются *лимфоциты*. Итогом их созревания являются две больших популяции *T- и B-лимфоцитов*, которые, хотя и образуются в результате общего пути дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток, но заканчивают эту дифференцировку в различных органах. Первые – в вилочковой железе (тимусе), что определяет их название – *тимусзависимые* или *T-лимфоциты*, вторые – в аналогах сумки Фабрициуса, это *бурсазависимые* (от латинского bursa – сумка) или *B-лимфоциты*.

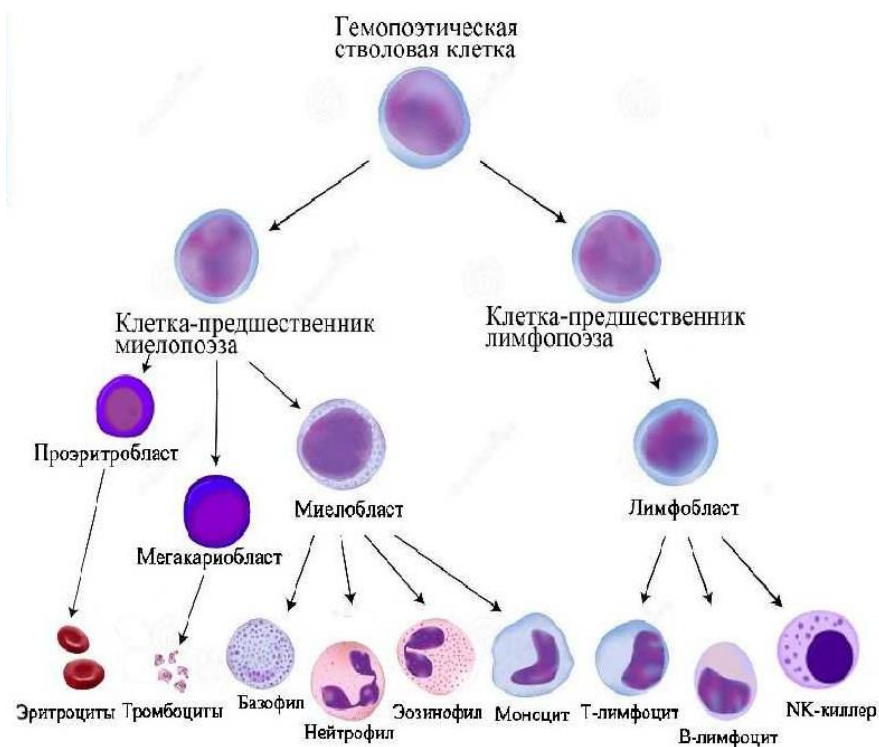


Рис. 2. Дифференциация стволовых клеток кроветворной ткани (по <https://triptonkosti.ru/22-foto/gemopoeticheskaya-stvolovaya-kletka-prezentaciya.html>)



*В-лимфоциты* – это клетки, обеспечивающие гуморальную компоненту иммунного ответа – образование антител. После взаимодействия с антигеном В-лимфоциты проходят ряд стадий дифференцировки до плазматических клеток, которые уже и продуцируют специфические антитела. В периферической крови количество В-лимфоцитов составляет в среднем 20% от общего числа лимфоидных клеток, а в селезенке и лимфатических узлах – около 40%.

*Т-лимфоциты* – это клетки, ответственные за реализацию таких компонентов иммунного ответа как гиперчувствительность замедленного типа, реакции отторжения и некоторые типы цитотоксических реакций. Они ответственны также за разрушение клеток, инфицированных внутриклеточными патогенами. Уничтожение внутриклеточных патогенов Т-клетками называется *клеточно-опосредованным иммунитетом*, или *клеточной невосприимчивостью*. Кроме того, в состав Т-популяции входят клетки-регуляторы иммунных реакций – Т-хелперы (помощники), усиливающие иммунный гуморальный или клеточный ответ, и Т-супрессоры, подавляющие его. Количество Т-лимфоцитов в периферической крови колеблется от 60 до 80% от общей численности лимфоидных клеток.

*Макрофаги* или *моноклеарные фагоциты* – это моноциты крови, а также моноциты, вышедшие из крови в ткани (тканевые макрофаги – подвижные альвеолярные, перитонеальные и фиксированные макрофаги печени и селезенки). Моноциты крови и тканевые макрофаги взаимодействуют с лимфоидными клетками в ходе формирования иммунного ответа, выполняя *афферентные*<sup>3</sup> *функции*. *Эфферентные*<sup>4</sup> *функции* активированных макрофагов выражаются в повышении фагоцитарной и микробицидной активности. К числу афферентных функций относятся захват и переработка антигена для *представления (презентации)* его Т-лимфоцитам в «удобной» для усвоения форме. Такой переработанный макрофагами антиген существенно более эффективен для активации Т-лимфоцитов, нежели исходный (нативный) антиген.

---

<sup>3</sup> Афферентный (от латинского afferens) - приносящий, центростремительный.

<sup>4</sup> Эфферентный (от латинского efferens) – выносящий, центробежный.

*Нейтрофилы* – сегодня есть все основания считать нейтрофилы важным элементом механизма поддержания антигенного гомеостаза, а их антибактериальное действие – частным случаем проявления этой функции.

Среди клеток, выполняющих иммунологические функции, сравнительно недавно обнаружены клетки, проявляющие *in vitro* цитотоксическое действие в отношении некоторых опухолевых, инфицированных вирусами и эмбриональных клеток в отсутствие антител и без предварительной сенсibilизации. Такие клетки были названы *естественными* или *натуральными (нормальными) киллерами*. Природа этих клеток пока однозначно не установлена.

Говоря о клеточных элементах ИС, следует упомянуть и о том, что они могут выделять *медиаторы клеточного иммунитета*, амплификаторы (усилители) функции клеток, осуществляющих защиту организма. Их иногда называют «гормонами» ИС. Обычно они продуцируются клетками ИС в ходе специфического иммунного ответа, однако, могут и неспецифически усиливать резистентность. Факторы, продуцируемые лимфоцитами, получили общее название *лимфокинов*, факторы, продуцируемые моноцитами, – *монокинов*. Как правило, лимфокины и монокины изучаются в первую очередь с точки зрения их функции, поэтому биохимическая природа их исследована хуже. Общими и наиболее характерными чертами медиаторов клеточного иммунитета являются, во-первых, их спонтанная продукция как *T*-, так и *B*-лимфоцитами, которая особенно усиливается при стимуляции этих клеток специфическими антителами или неспецифическими растительными *митогенами*<sup>5</sup>, во-вторых, высокая биологическая активность при низкой концентрации, в-третьих, наличие среди лимфокинов как специфических по отношению к конкретному антигену, так и неспецифических факторов, в-четвертых, способность взаимодействовать с различными клетками-«мишенями»,

---

<sup>5</sup> Митогены — пептиды или небольшие белки, индуцирующие клеточное деление (митоз).

участвующими и не участвующими в воспалительных процессах (соответственно лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги и фибробласты, эндотелиальные клетки, остеокласты).

Разумеется, фактическая картина функционирования клеточных элементов ИС и их взаимодействий с гуморальными факторами при формировании иммунного ответа куда сложнее, чем представлено в настоящем разделе. Но для целей настоящего пособия дальнейшая детализация будет явно излишней, а если у его читателей возникнет интерес к таким деталям, необходимую информацию можно найти в той литературе, что указана перечне ссылок на нее.

\*\*\*

#### *Контрольные вопросы*

- 1. Какие клетки входят в ИС, их происхождение?*
- 2. Основные характеристики клеточных элементов ИС?*

### **1.3. Гуморальные элементы системы иммунитета**

[2, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 26, 36, 41, 45, 49, 52, 55, 54, 56, 57, 58]

*Гуморальным иммунитетом* обычно именуют иммунитет, в котором в качестве основных эффекторных элементов выступают специфические антитела, синтезируемые в периферической лимфоидной ткани и плазматическими клетками – результатом пролиферации и дифференцировки активированных антигеном В-лимфоцитов.

Однако кроме антител в иммунном ответе участвуют уже упоминавшиеся в главе 1.2 медиаторы клеточного иммунитета – лимфокины и монокины, а также *система белков комплемента*.

Комплемент представляет собой одну из важнейших полифункциональных систем организма. Он является основным усилителем воспалительных реакций,

а также антителозависимых эффектов (усиления фагоцитоза, бактерицидных и литических реакций).

Комплемент – это важный компонент как врождённого, так и приобретённого иммунитета. Он обеспечивает цитотоксическое и цитолитическое действие антител на клетки-мишени, активирует фагоцитоз, участвует в индукции иммунного ответа, в реакции анафилаксии, а также в развитии воспаления. Возможно, что участие в развитии воспаления – это в эволюционном аспекте есть его главная (первичная) функция, которая лишь в последующем оказалась связанной с антителами и другими иммунологическими механизмами.

Свое название комплемент (от латинского *complementum* — дополнение, довершение) получил благодаря тому, что он дополняет и усиливает действие антител и фагоцитов, защищая организм человека и животных от большинства бактериальных инфекций. Это сложный комплекс белков, представленный главным образом во фракции бета-глобулинов, насчитывающий около 20 взаимодействующих компонентов. – С1 (комплекс из трех белков), С2, С3, ..., С9, фактор В, фактор D и ряд регуляторных белков. Все эти компоненты — растворимые белки с молекулярной массой от десятков тысяч до сотен тысяч дальтон, циркулирующие в крови и тканевой жидкости. Они синтезируются в основном в печени и составляют приблизительно 5 % от всей глобулиновой фракции плазмы крови (или 10 % от всех белков сыворотки крови). Установлено, что около 90 % компонентов комплемента синтезируется гепатоцитами и другими клетками печени, а также моноцитами/макрофагами и нейтрофилами.

В норме все компоненты комплемента – это неактивные или малоактивные соединения, но они могут последовательно активироваться за счет отщепления или присоединения некоторых пептидных факторов и факторов активации, т. е. система комплемента относится к числу «триггерных» энзиматических систем, она характеризуется быстрым и стремительно усиливающимся (каскадным) ответом на стимуляцию, для которого характерно, что продукты одной реакции являются катализаторами для следующей.

Одни авторы (см. напр. [8, 54]) описывают два пути активации комплемента – классический (с участием антител) и альтернативный (без участия антител) (рис. 3). Другие [3, 22] указывают уже три пути активации – по классическому, альтернативному и лектинозависимому пути (рис. 4).

При активации комплемента образуется мембраноатакующий комплекс (МАК), формирующий трансмембранный канал в клеточной мембране. Механизм действия этого комплекса на клетку до конца не выяснен. Однако известно, что этот комплекс внедряется в мембрану, образует как бы воронку с нарушением целостности мембраны, что приводит к выходу из клетки низкомолекулярных компонентов цитоплазмы, а также белков, поступлению в клетку воды и в итоге – к гибели клетки. Фрагменты *C3b*, *C4b* являются опсонинами, участвующими в фагоцитозе, а фрагменты *C3a*, *C5a* – анафилатоксинами, принимающими участие в анафилактических реакциях.

Катаболизм компонентов комплемента самый высокий по сравнению с другими белками сыворотки крови, с обновлением в течение суток до 50 % белков системы.

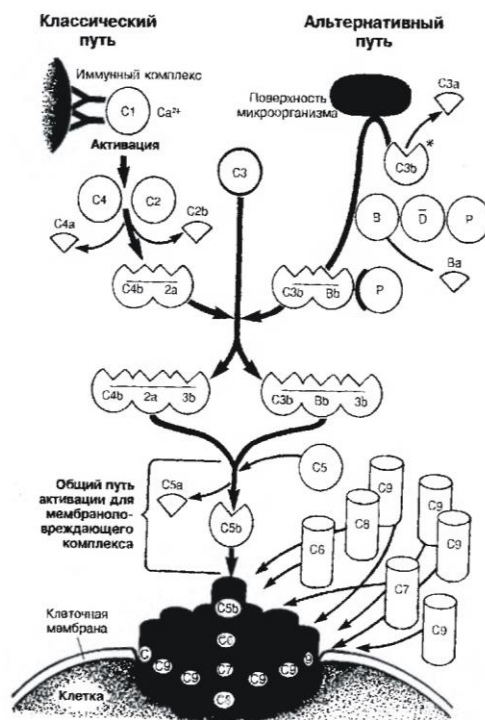


Рис. 3. Активация системы комплемента по Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B. Mechanism of microbial diseases, 2nd ed, Williams & Wilkins, 1993, цит. По [8.]

Как уже говорилось, в основе защитных эффектов гуморального иммунитета лежит реакция антиген-антитело, которая является важнейшим механизмом элиминации патогенов из организма. Однако для целей настоящего пособия более важным обстоятельством является то, что на основе реакции антиген-антитело построена система серологических исследований в рамках КЛД всей инфекционной и отчасти неинфекционной патологии. В связи с этим есть смысл более подробно охарактеризовать оба компонента этой реакции.

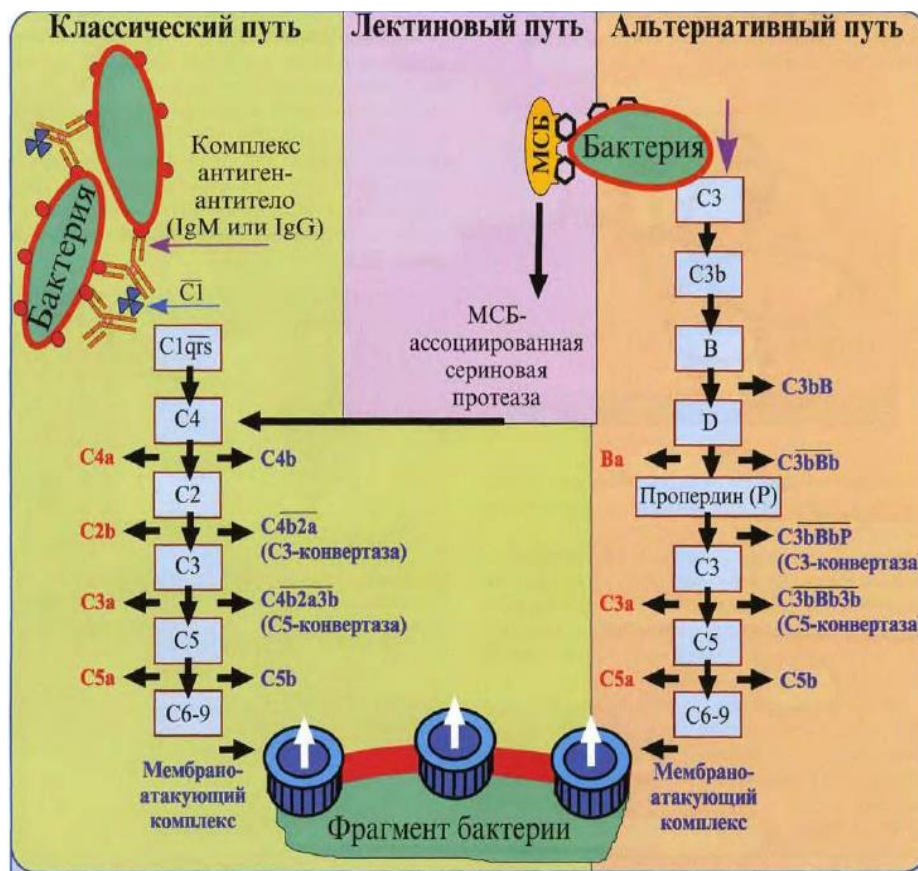


Рис. 4. Схема путей активации комплемента по [3].

*Классический путь активации комплемента* начинается с присоединения *C1* к комплексу антиген-антитело (к Fc-фрагменту антитела), последующего расщепления *C4*, *C2*-компонентов комплемента и образования *C3/C5*-конвертаз (протеаз).

*Альтернативный путь активации комплемента* происходит без участия антител, в результате активации антигеном системы комплемента и факторов *B*, *O*, *P*, *H* с образованием *C3/C5*-конвертаз (протеаз).

*Лектиновый путь активации комплемента* инициируется маннан-связывающим белком (МСБ). МСБ связывается с маннозой поверхности микробной клетки с последующим расщеплением *C4*-, *C2*-компонентов комплемента и образованием *C3*-конвертазы.

*Мембраноатакующий комплекс.* Активация комплемента заканчивается формированием мембраноатакующего комплекса (МАК), состоящего из *C5*-, *C6*-, *C7*-, *C8*-, *C9*-компонентов комплемента, которые внедряются в мембрану клетки и образуют канал диаметром 10 нм. В результате образования многочисленных МАК-комплексов клетки разрушаются.

### ***1.3.1. Антигены***

В 1903 г. было введено понятие «*антиген*» (от англ. *antibody generator* - генератор антител) для обозначения веществ, на которые реагирует иммунная система, обеспечивая их удаление из организма. Первоначально термин применяли для обозначения любой молекулы, индуцирующей образование специфических антител. Однако теперь этот термин имеет более широкий смысл, означая любую молекулу, которую могут специфически распознавать элементы системы приобретенного иммунитета. При чем их роль не ограничивается гуморальным иммунитетом, т.е. стимуляцией выработки антител; антигены играют также существенную роль в стимуляции клеточного иммунитета, и по этой причине антигены иногда называют *иммуногенами*.

Следует, однако, сказать, что, несмотря на более чем столетнюю историю исследования указанных объектов, их корректного и содержательного определения, как явления, так и не предложено, поскольку все попытки сформулировать понятие «антиген», приводимые в соответствующих учебниках и руководствах, сводятся в итоге либо к «определению» антигена, как вещества «чужеродного»

организму, либо к перечислению свойств веществ, относимых к антигенам. Однако понятие «чужеродность», через которое нередко определяется понятие «антиген», само не имеет логического определения, в чем несложно убедиться, обратившись к соответствующим словарям русского языка. В них мы можем найти только синонимы термину «чужеродный», но никак не определение этого понятия через более общее.

#### **Определения термина «чужеродный»:**

**Толковый словарь Ушакова (Д.Н.Ушаков. 1935-1940).** То же, что инородный.

**Словарь синонимов русского языка (З. Е. Александрова. 2011).** Инородный, посторонний.

**Толковый словарь Ожегова (С.И. Ожегов, Н.Ю. Шведова. 1949-1992).** То же, что инородный.

**Толковый словарь Ефремовой. (Т. Ф. Ефремова. 2000).** Обладающий совсем иными свойствами; посторонний, чуждый, инородный. Не воспринимаемый, отвергаемый организмом; инородный.

**Большой современный толковый словарь русского языка (2012).** Обладающий совсем иными свойствами; посторонний, чуждый, инородный. Не воспринимаемый, отвергаемый организмом; инородный.

**Энциклопедический словарь (2012).** То же, что инородный.

Более того, даже ссылка на «генетическую чужеродность» не делает определение понятия «антиген» более корректным и содержательным, поскольку эта самая «генетическая чужеродность» просто отождествляется с «антигенностью» (см. напр. <https://top-technologies.ru/en/article/view?id=22908> ).

К счастью, такая терминологическая неопределенность, хотя и может вызывать у читателей вполне естественное неприятие, пока еще не сказывается на той чисто практической части иммунохимии, изложение которой является основной задачей настоящего пособия. Потому будем считать вполне достаточным более интуитивное, нежели логически обоснованное представление о сущности явления, которое дают формулировки типа «*Антигены* - генетически чужеродные



вещества, способные вызывать образование антител и эффекторов клеточного иммунитета» и сосредоточимся на тех их характеристиках, которые уже представляют либо смогут со временем представлять наибольший интерес с практической точки зрения.

Вначале рассмотрим классификацию антигенов. Так, в учебном пособии Максимовой Н.Е. с соавторами [26] антигены разделены по происхождению на *экзогенные* и *эндоантигены*, по генетическим отношениям – на *изоантигены*, *аллоантигены* и *ксеноантигены*, по способности вызывать иммунный ответ – на *полноценные антигены (иммуногены)* и *неполноценные (гаптены)*, по способности реагировать с разными популяциями лимфоцитов – на *тимусзависимые* и *тимуснезависимые*. Кроме перечисленных выделены еще *дифференцировочные антигены*, или *CD-антигены*.

Как можно заметить, отсутствие корректных и содержательных определений (хотя – это беда не только теоретической иммунологии) приводит к прямо противоречащим друг другу положениям. Так, в приведенной выше классификации к антигенам, хоть и неполноценным, отнесены гаптены. Это относительно низкомолекулярные соединения (липиды, нуклеиновые кислоты, другие органические и неорганические вещества растительного и животного происхождения, продукты химических производств, в том числе некоторые лекарственные вещества), аналогичные по структуре антигенным детерминантам и способные связываться с антителами к указанным детерминантам, но неспособные инициировать их образование. Некорректность наименования гаптен *неполноценными антигенами* заключается в том, что гаптены при этом классифицируются как *вид антигенов*, хотя они не обладают основной, по сути, характеристикой этого класса соединений – способностью инициировать образование специфических антител.

Такая способность возникает при соединении гаптен с высокомолекулярными соединениями-носителями (белками, полисахаридами, искусственными высокомолекулярными полиэлектролитами). Конъюгаты, образующиеся в результате присоединения гаптена к носителю, имеют три вида специфичности –

по гаптену, по носителю и по участку соединения гаптена с носителем, но возможны ситуации, когда гаптен перекрывает собственные детерминанты носителя. Если этого не происходит, гаптен расположенный на поверхности конъюгата, сообщает ему дополнительную «валентность» (сверх валентности, определяемой числом антигенных детерминант носителя). При иммунизации животных такими конъюгатами, которые отличаются только гаптенами, происходит индукция антител с различной специфичностью, зависящей от гаптенной детерминанты, а не от белка-носителя. В то же время одна и та же детерминанта на разных носителях обеспечивает выработку антител одной и той же специфичности, но с различной антигенностью, зависящей от молекулы носителя.

Открытие гаптенных и их последующее изучение позволило установить, что антитела и антигенраспознающие рецепторы лимфоцитов взаимодействуют не со всей молекулой антигена, а лишь с ее антигенными детерминантами (эпитопами). Но изучение гаптенных имеет не только теоретическое значение для понимания явления антигенной специфичности, но и практическое, поскольку гаптенами являются многие биологически важные соединения, включая пептидные и стероидные гормоны, циклические аденозинмонофосфат и гуанозинмонофосфат, лекарства и т.д. Их конъюгаты с белком позволяют получать соответствующие антигаптенные антитела, которые затем используются в тест-системах для определения содержания этих гаптенных в биологических жидкостях организма (например, тест на беременность, основанный на выявлении в моче хорионического гонадотропина с помощью антител к соответствующему конъюгированному антигену).

Но при всей ценности открытия и последующего изучения гаптенных называть их антигенами, пусть даже неполноценными, все же следует, поскольку при этом возникает противоречие с определением понятия «антиген», т.е. не следует повторять ошибки ряда авторов, которые, как, например, Г.Н. Дранник в монографии «Клиническая иммунология и аллергология» [16], определив антигены как «...вещества, обладающие двумя основными свойствами: 1) иммуногенно-

стью...; 2) антигенностью ...», тут же называют гаптены *антигенами, не обладающими иммуногенностью*. Логичнее выделять гаптены, как самостоятельный класс веществ, которые аналогично антигенам способны взаимодействовать с антителами, но индуцировать их образование сами по себе неспособны (см. рис. 5).

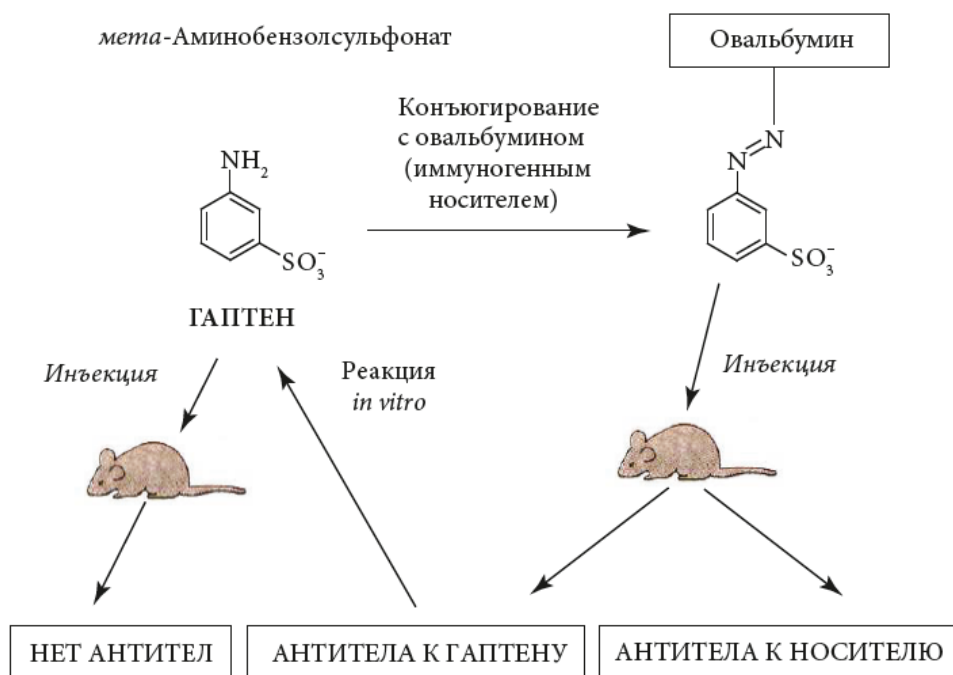


Рис. 5. Свойства гаптена (по [26]).

К характеристикам антигенов, которые необходимо знать всем имеющим отношение к разработке и производству иммунохимических тестов, очевидно, относятся те, что определяют способность этих веществ инициировать образование антител и участвовать в реакциях взаимодействия с ними, внешние проявления которых могут быть использованы в диагностических целях.

Нужно сказать, что перечни таких свойств антигенов и формулировки их определений, которые приводятся разными авторами, не всегда совпадают друг с другом и не всегда логически обоснованы. Так, в большинстве случаев в этих перечнях упоминаются *специфичность, иммуногенность, антигенность*. Некоторые авторы (см., например, [8]) добавляют к ним *чужеродность*, хотя другие авторы считают это свойство составной частью *иммуногенности* [16]. При этом

под *специфичностью* антигена понимают способность антигена индуцировать иммунный ответ к *строго определенным антигенным детерминантам* [2] или способность избирательно реагировать со *специфическими антителами, сенсibilизированными лимфоцитами*, которая определяется антигенными детерминантами [26, 45], под *иммуногенностью* – способность вызывать специфическую защитную реакцию [2, 36, 45], а под *антигенностью* – способность вызывать образование антител и взаимодействовать с ними [2, 36]. Свойство *чужеродности* в публикациях по иммунологии специального толкования не имеет, но, как уже говорилось, оно может отождествляться с *антигенностью*. Поэтому ограничимся чаще всего упоминаемыми свойствами – *специфичностью, антигенностью, иммуногенностью*.

*Специфичность антигена* связана с *антигенными детерминантами (эпитопами)*. *Эпитопы (антигенные детерминанты)* – это специфические участки молекулы антигена, к которым вырабатываются специфические антитела, и с которыми реагируют продукты иммунного ответа (см. рис. 6). Если антигеном является глобулярный белок, его детерминанты могут быть представлены десятью-шестнадцатью аминокислотными остатками, если пептид – пятью-шестью аминокислотными остатками, если полисахарид – несколькими молекулами гексоз. У белков изменение одной единственной аминокислоты способно приводить к изменению специфичности антигена.

У белков различают: а) *секвенциальные детерминанты* - детерминанты, образованные аминокислотной последовательностью (т.е. зависящие от первичной структуры белка), б) *конформационные детерминанты* – детерминанты, образованные третичной структурой белка. При иммунизации белком антитела образуются в основном к конформационным детерминантам. Изменение конформации белка приводит к изменению его антигенной специфичности.

Обычно размеры эпитопов чрезвычайно малы (4-5 аминокислотных или моносахаридных остатков). Антигены *мультивалентны*, т. е. имеют, как правило, большое количество эпитопов, к каждому из которых в организме могут быть

образованы свои специфические антитела. Эпитопы могут быть *линейными* (части аминокислотных последовательностей молекулы) или *конформационными* (результат свертывания молекулы в клубочек), в зависимости от пространственной конфигурации белковой молекулы они могут включать несколько участков ее полипептидов, расположенных вблизи друг от друга, формируются при образовании вторичной и третичной структуры полипептида, или при объединении нескольких полипептидов, т.е. при образовании четвертичной структуры; эпитопы разрушаются при денатурации или гидролизе белка.

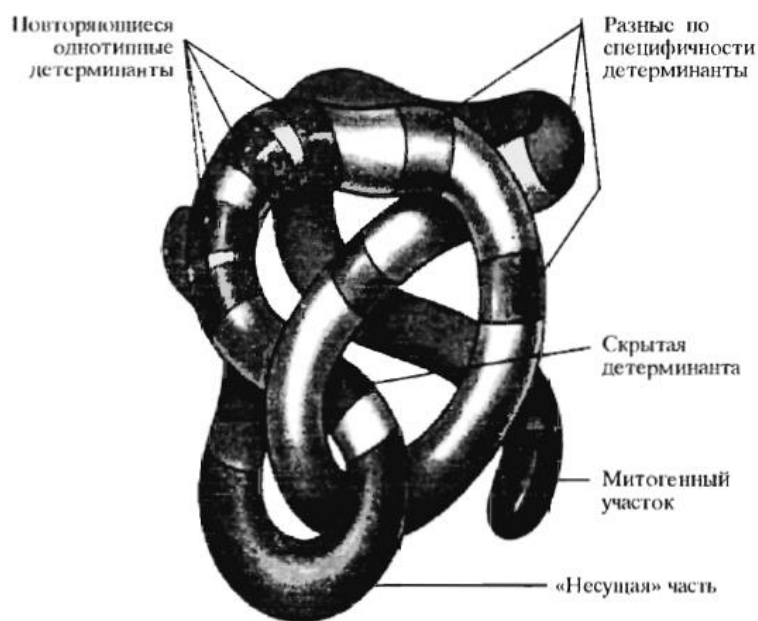


Рис. 6. Условный образ антигена (по [45])

Эпитопы, которые распознаются антигенными рецепторами *B*- и *T*-лимфоцитов, различаются между собой. Эпитопы, распознающиеся *B*-клетками, называют эпитопами конформационного типа. Они образованы аминокислотными остатками, которые входят в состав различных участков белковой молекулы, но оказываются сближенными в пространственной конфигурации белковой глобулы. Находятся такие эпитопы на внешней поверхности антигена, образуя петли и выступы. Обычно число аминокислот или сахаров в них составляет от 6 до 8. При этом антигенраспознающие рецепторы *B*-лимфоцитов распознают нативную (пространственную) конформацию эпитопа, а не линейную последовательность

аминокислотных остатков. Эпитопы, распознающиеся  $T$ -лимфоцитами, представляют собой линейную последовательность аминокислотных остатков, составляющих часть антигена, и включают большее число аминокислотных остатков по сравнению с предыдущими.

Одна из причин, по которой трехмерная сложность антигенов так важна, заключается в том, что антитела и  $T$ -лимфоциты распознают и взаимодействуют не со всем антигеном целиком, а только с эпитопами. Один антиген может обладать несколькими различными эпитопами, и разные антитела могут связываться с разными эпитопами одного и того же антигена (рис. 7).

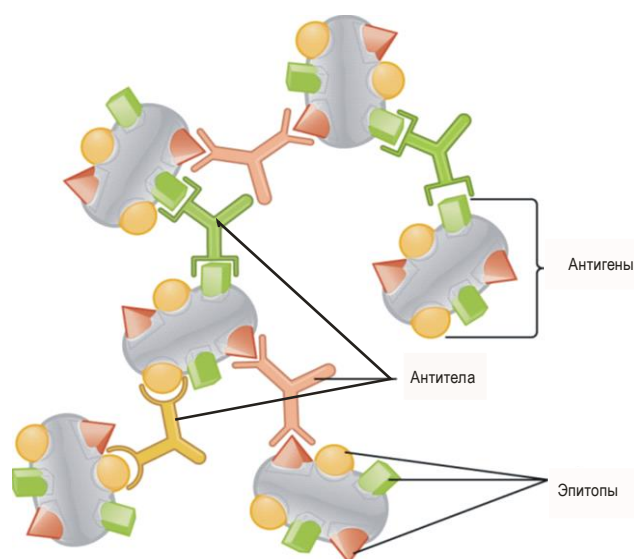


Рис. 7. Схема взаимодействия антител с эпитопами (по [58])

*Иммуногенность антигена* – это, как уже говорилось, его способность вызывать специфическую защитную реакцию; иммуногенностью обладают белки, полисахариды, полипептиды, нуклеиновые кислоты. Поскольку речь идет о «защите», термин «иммуногенность» используется как синоним *протективной активности* и, прежде всего, для характеристики антигенов, участвующих в формировании антиинфекционного иммунитета, и в этом плане иммуногенность различных антигенов неодинакова. Она зависит от степени чужеродности вещества, от его молекулярной массы, (с увеличением молекулярной массы иммуногенность вещества возрастает), от физического состояния (корпускулярные анти-

гены – эритроциты, бактерии – более иммуногенны, чем растворимые), от химического состава (чем сложнее вещество, тем оно более иммуногенно, так сополимеры разных аминокислот гораздо иммуногеннее гомополимеров одной аминокислоты) и пространственной структуры молекул (наиболее иммуногенны белки), от места (способа) введения, причем иммуногенность разных антигенов по разному зависит от места (способа) введения, так, полиомиелитная вакцина наиболее иммуногенна при пероральном введении, вакцина БЦЖ – при внутрикожном, вакцина против столбняка – при внутримышечном введении. К факторам, определяющим иммуногенность, следует относить и способность иммунной системы реципиента к адекватному ответу на встречу с антигеном.

С точки зрения основной задачи настоящего пособия, значительно важнее другое свойство антигенов – их *антигенность (чужеродность)*, т.е. способность вызывать образование антител и взаимодействовать с ними. Существенным для проявления антигенности какого-либо вещества является сложность и устойчивость его пространственной структуры, устойчивость к ферментативному гидролизу, а применительно к белкам - наиболее сложным органическим соединениям, которые одновременно относятся к наиболее обширному и значимому классу антигенов, имеет значение и эволюционная близость белков донора и реципиента.

Антигенность может совпадать с иммуногенностью, но это не обязательно. Так, известны вирусные антигены, образование антител к которым сопровождается не понижением, а повышением чувствительности организма к последующему заражению таким вирусом.

При сопоставлении антигенности и иммуногенности нередко в качестве примера используют гаптены, однако, как уже говорилось, такое сопоставление некорректно, поскольку гаптены сами по себе не способны вызывать образование антител, а по определениям и антигенности, и иммуногенности антигенов эта способность все же стоит на первом месте. Соответственно, сравнивать «антигенность и иммуногенность гаптен» означает использовать для сравнения свойство, которыми эти вещества не обладают.

Различают следующие виды антигенной специфичности:

*гетерогенная (ксеногенная)* - обусловлена общими для представителей разных видов антигенным и комплексами или чаще общими антигенными детерминантами на различающихся по другим признакам комплексах;

*видовая (аллогенная)* – обусловлена антигенами, присущими только одному виду животных;

*групповая* – обусловлена антигенами разных групп особей одного вида животных (*изоантигенами*), к этому же виду специфичности относятся *сингенная* (специфичность особей животных в пределах одной чистой инбредной линии) и *клональная* (специфичность в пределах клона особей, полученных от одного организма);

*аллогенная (аллотип)* – обусловлена различиями антигенов внутри вида животных, в микробиологии – это *типоспецифичность*, обусловленная различиями разных штаммов одного вида микробов;

*аутоантигенная* – обусловлена белками индивидуальности (антигенами тканевой совместимости) т.е. собственными «опознавательными знаками», имеющимися только в клетках данной особи. Исключением являются аутоантигены однояйцевых близнецов, особей одной чистой инбредной линии или клона животных, полученных путем клонирования одного организма;

*функциональная* - обусловлена различиями функциональных характеристик макромолекул;

*дифференцировочная* – обусловлена поверхностными дифференцировочными антигенами (антигенными маркерами), которые выявляются с помощью моноклональных антител и используются для идентификации клеточных популяций и субпопуляций лейкоцитов, в том числе Т- и В-лимфоцитов, стадий их дифференцировки;

*стадиоспецифичность* – обусловлена антигенами, появляющимися и исчезающими на определенных стадиях развития организма;

*патологическая* – обусловлена различиями антигенов, возникающих при некоторых видах инфекционной и неинфекционной патологии;



*органоспецифичность* – обусловлена различиями антигенов из разных органов одной особи;

*тканеспецифичность* – обусловлена различиями антигенов из разных видов тканей;

*органойдоспецифичность* – обусловлена различиями антигенов из разных органелл;

*гаптеноспецифичность* – обусловлена различиями антигенов с разными гаптеновыми группировками.

Интенсивность иммунного ответа на антиген может быть усилена введением его с *адьювантом* – веществом, способствующим депонированию антигена в тканях, стимулирующим фагоцитоз и оказывающим митогенное действие на лимфоциты, что и приводит к неспецифическому усилению ответа. В качестве адьювантов используют гидроокись или фосфат алюминия, эмульсию минеральных масел. Так, адьювант Фрейнда, который часто используют в иммунологии, представляет собой смесь минерального масла, эмульгатора и убитых микобактерий туберкулеза [16, 27].

В публикациях, посвященных иммунологическим проблемам, нередко используется специфическая терминология, своего рода «научный жаргон», и для изучающих иммунологию (даже с чисто практическими целями) полезно знать набор устоявшихся терминов, приведенный в табл. 1

Таблица 1.

Некоторые устоявшиеся названия антигенов (по [10])

Название	Антигены
Корпускулярные антигены	Различные клетки (бактерии, грибки, простейшие, эритроциты)
Растворимые антигены	Белки различной степени сложности, полисахариды, липополисахариды
Ксеноантигены	Антигены тканей и клеток, отличающиеся от реципиента на видовом уровне
Аллоантигены	Антигены тканей и клеток, отличающиеся от реципиента на индивидуальном уровне

Трансплантационные антигены	Антигены клеточной поверхности, контролируемые главным комплексом гистосовместимости
Аутоантигены	Антигены собственных клеток, полимерных молекул
Аллергены	Антигены пищи, пыли, пыльцы растений, ядов насекомых, вызывающие повышенную реактивность
Толерогены	Антигены клеток, белков, вызывающие ареактивность
Синтетические антигены	Искусственно синтезированные полимеры аминокислот, углеводов

Свойство *антигенности* принято связывать также с понятиями *аффинитет* (*аффинность*), *авидность* и *валентность* антигенов. Те же три характеристики мы встречаем и в описаниях свойств антител (см. следующий раздел).

Но, если *валентность антигена*, т.е. число детерминант (эпитопов) на его молекуле, равно как и *валентность антитела*, т.е. число его активных центров (см. раздел 1.3.2), – это однозначно свойства антигена и антитела безотносительно того, вступили они во взаимодействие или нет, то с понятиями «аффинность» и «авидность» мы сталкиваемся только в связи с образованием комплекса антиген-антитело. И, следовательно, как «аффинность», так и «авидность» – это, по сути, свойства указанного комплекса, а не антигенов и антител, как таковых. По этой причине более детально они будут описаны в главе 1-4 «Иммунный ответ. Фазы взаимодействия антигена и антитела».

В зависимости от особенностей механизмов инициации образования антител антигены делятся на *T-зависимые* и *T-независимые*.

*T-зависимые*, составляющие большинство известных антигенов, индуцируют иммунный ответ с участием Т- и В-лимфоцитов. Они распознаются Т-лимфоцитами, участие которых необходимо также для активации В-лимфоцитов, с последующим превращением последних в плазматические клетки, продуцирующие антитела. Т-зависимые антигены предварительно фагоцитируются макро-

фагами или другими антигенпредставляющими клетками; частично перерабатываются в них с последующей экспрессией фрагментов антигена с антигенной детерминантой на поверхность клетки, где происходит представление антигена Т-лимфоцитам.

*Т-независимые антигены* вызывают иммунный ответ без участия Т-клеток, индуцируя лишь антителообразование, причем комплексы «Т-независимый антиген-антитело» обладают низким аффинитетом.

Антигены можно классифицировать также по их происхождению – на *экзогенные* и *эндогенные*, по химической природе – на *белковые* и *небелковые* (полисахариды, липиды, НК, ЛПС), по молекулярной структуре – на *глобулярные* и *фибриллярные*, по степени чужеродности – на *гетероантигены* (видовые), *аллоантигены* (групповые), *изоантигены* (индивидуальные), по направленности активации и обеспеченности иммунного реагирования – на *иммуногены* (*Т-зависимые* и *Т-независимые*), *толерогены* и *аллергены*.

В практике КЛД используются как *корпускулярные* (как правило клетки), так и *растворимые* антигены. Последние могут быть получены при разрушении корпускулярных, при этом обычно получается смесь антигенов, входивших в различные структуры разрушенных клеток. Смесь может быть разделена на отдельные антигены с использованием *иммуноэлектрофореза*.

Несложно заметить, что приведенные в настоящем разделе формулировки основных свойств антигенов «определениями», как логическими конструкциями, на деле не являются, поскольку в них «определяемое» явление сопоставляется не с более общим явлением, а с явлением (явлениями) того же порядка общности. В самом деле, что дает для понимания сути этих свойств «определение» *специфичности* через способность индуцировать образование только *специфических антител* и реагировать только с ними, или «определение» *иммуногенности* через способность вызывать *специфическую защитную реакцию*, или «определение» *антигенности* через способность *вызывать образование антител и взаимодействовать с ними*. Но из приведенных «определений» с очевидностью следует, что все эти способности – отнюдь не независимые свойства веществ,

названных антигенами. Более того, и *специфичность*, и *иммуногенность*, и *антигенность* – это, скорее всего, разные проявления (проекции) одного и того же механизма, который принято называть механизмом защиты, но который, скорее, является механизмом приспособления живых объектов определенного класса (теплокровных Земных животных) к попаданию в их внутреннюю среду микроорганизмов и, соответственно, продуктов их жизнедеятельности и/или распада. По-видимому, это результат эволюции такого механизма, т.е. инфекция, действительно, может считаться основным естественным явлением, определившим возникновение всех иммунологических феноменов, а многие проблемы современной иммунологии, не связанные с инфекциями, – это скорее следствие нарушения естественного хода взаимодействия теплокровных организмов с окружающей средой.

### 1.3.2. Антитела (иммуноглобулины)

Хотя не только в адаптированных, но и во вполне профессиональных публикациях *антитела* по-прежнему «определяются» как «специфический ответ на антигены», все же в отличие от последних этот класс веществ может быть определен более содержательно. Антитела – это семейство сывороточных белков гамма-глобулинов, вырабатываемых плазматическими клетками (плазмоцитами) в ответ на попадание во внутреннюю среду организма веществ, несущих чужеродную для него информацию, и способные взаимодействовать с указанными веществами. Их также можно рассматривать как растворимую форму антигенсвязывающих рецепторов В-лимфоцитов.

Сывороточные белки делятся на альбумины и глобулины, последние, в свою очередь, по электрофоретической подвижности делятся на альфа-, бета- и гамма-глобулины.

Гамма-глобулины – это наименее подвижная в электрическом поле фракция белков сыворотки крови, в норме составляющая у человека около 30 % от

всех ее белков. В соответствии с Международной классификацией гамма-глобулины (гликопротеины), несущие функции антител, получили название *иммуноглобулины* и обозначаются символом Ig.

Ig специфически распознают самые разнообразные антигены и гаптены; они взаимодействуют с другими иммунокомпетентными клетками, имеющими к ним соответствующие рецепторы, а также активируют систему комплемента. Фактически, антитела действуют как молекулы-посредники, вовлекающие различные элементы ИС в распознавание потенциальных патогенов, а применительно к микробам – и продуктов их метаболизма.

Ig циркулируют в крови и жидкостях организма (лимфе, тканевой жидкости), а также содержатся в различных секретах организма (материнском молоке, слезах, слюне и др.). Будучи белками, Ig сами обладают выраженной антигенностью.

Помимо того, что антитела имеют решающее значение для нашего нормального иммунного ответа, они являются мощными инструментами для исследовательских и диагностических целей. Высокая специфичность антител делает их отличным инструментом для обнаружения и количественной оценки широкого спектра мишеней, от лекарственных препаратов до сывороточных белков и микроорганизмов. С помощью анализов *in vitro* антитела могут быть использованы для осаждения растворимых антигенов, агглютинации (слипания) клеток, опсонизации и уничтожения бактерий с помощью комплемента, а также нейтрализации лекарств, токсинов и вирусов.

Выявление связи гамма-глобулинов с иммунным ответом явилось стимулом для разработки методов выделения этой фракции, и к настоящему времени известно большое число различных методов фракционирования сывороточных белков – физических (ультрафильтрация через полупроницаемые мембраны, ультрацентрифугирование, разделение белков методами хроматографии, электрофореза), химических и физико-химических (высаливание нейтральными солями – сернокислым аммонием, хлористым натрием, сернокислым натрием и некоторыми другими; изоэлектрическое осаждение, разведение с изменением ионной

силы раствора; фракционирование при помощи органических осадителей - этилового и метилового спирта, ацетона, эфира; осаждение при помощи органических и неорганических катионов; осаждение при помощи анионов; применение ионообменных смол). Их них наиболее простым в применении и недорогим является риваноловый метод получения гамма-глобулинов – добавление к сыворотке крови тройного объема 0,4 % раствора риванола с последующим отделением выпавших в осадок альбуминов и основной массы альфа- и бета-глобулинов и удалением из раствора риванола с помощью активированного угля.

### 1.3.2.1. Структура иммуноглобулинов

Молекулы *Ig* состоят из двух видов фрагментов (рис. 8): *Fab* (fragment antigen binding, англ.) — антигенсвязывающего и *Fc* (fragment crystalline, англ.) — кристаллизующегося.

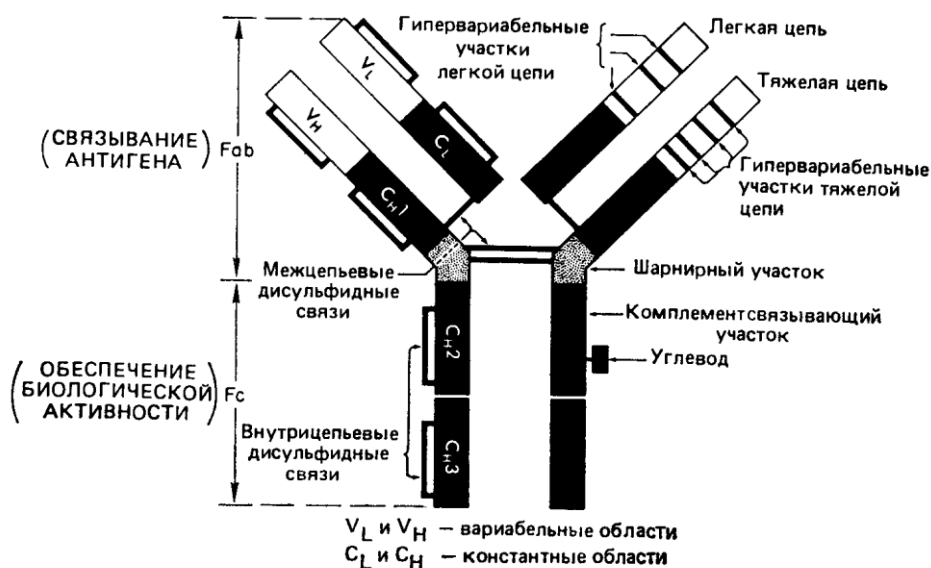


Рис. 8. Структура молекулы иммуноглобулина  
 (по Wasserman R.L., Capra J.D. Immunoglobulins. In: The Glycoconjugates, ed. by M. I. Horowitz and W. Pigman. Academic Press, New York, 1977; цит. По [41])

*Fab* -специфический участок, антигенсвязывающий фрагмент; *Fc* – неспецифический участок, отвечающий за фиксацию на мембранах клеток, связывание комплемента, проникновение через мембраны

Антигенсвязывающий участок (активный центр) образуется при участии одной *L*- и одной *H*-цепи, что обуславливает наличие у каждого антитела сходных активных центров, к каждому из которых может присоединиться по одной антигенной детерминанте. Следовательно, каждое антитело имеет минимум два активных центра, может связывать две антигенные детерминанты (двухвалентность антител или их мономеров) и обладает моноспецифичностью, т. е. способностью связывать лишь совершенно одинаковые антигенные детерминанты. Если на молекулу *IgG* воздействовать папином, она распадется на три фрагмента – два *Fab*-фрагмента и один *Fc*-фрагмент. Область, в которой соединяются *Fab*- и *Fc*-фрагменты молекул *Ig*, называется шарнирной. За счет шарнирной области субъединицы молекул *Ig* (цепи) обладают способностью к вращению по отношению друг к другу, что обуславливает гибкость их молекул.

Все иммуноглобулины человека построены однотипно и состоят из двух идентичных тяжелых полипептидных цепей (*H*-цепей – *Heavy chains*) и двух идентичных легких полипептидных цепей (*L*-цепей – *Light chains*), которые связаны между собой посредством ковалентных дисульфидных мостиков (*-S-S-*) (Рис. 8). Каждая полипептидная *L*- и *H*-цепь состоит из переменной области (*V*-области,  $V_L$  и  $V_H$ ) и константной области (*C*-области,  $C_L$  и  $C_H$ ) (рис. 8, 9). У каждой легкой цепи имеется одна *V*-область и одна *C*-область. У каждой тяжелой цепи имеется одна *V*-область и от до 5 гомологичных константных участков, состоящих примерно из 110 остатков аминокислот и имеющих сходную пространственную организацию. Эти участки образуют компактные, относительно изолированные пространственные структуры, скрепленные дисульфидной связью, и обладают автономными функциями. Такие структуры называют доменами (рис. 9).

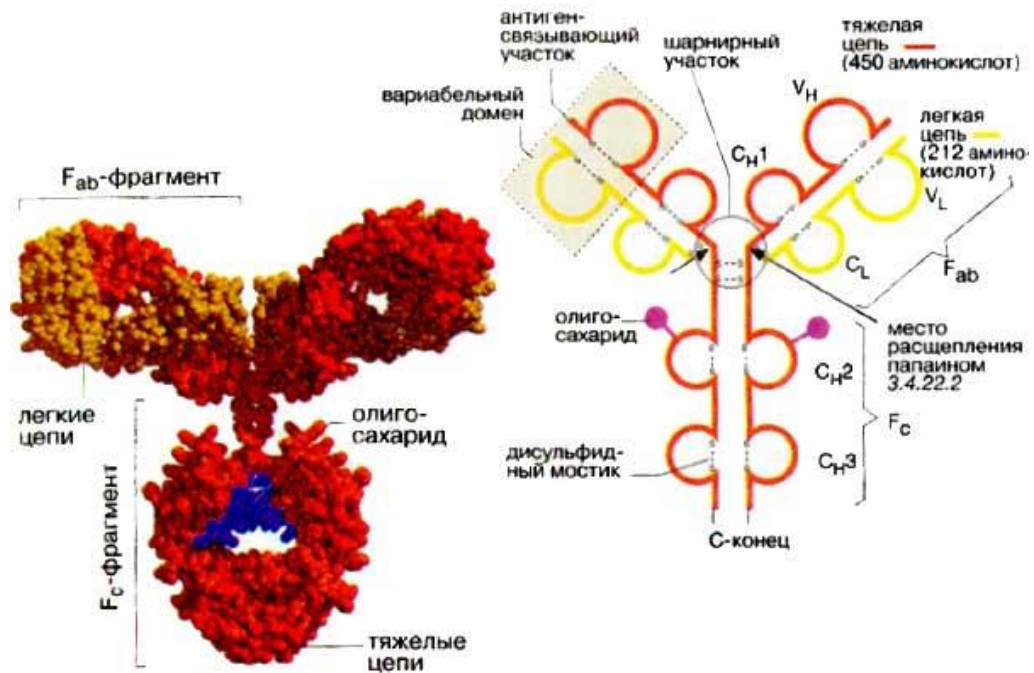


Рис. 9. Доменная структура *Ig* (по [17]).

Во всех цепях лишь *H*-концевой домен имеет отношение к распознаванию антигена. Это связано с тем, что цепи индивидуальных молекул *Ig*, как правило, отличаются первичной структурой данного домена (отсюда его название - переменный, или *V*-домен –  $V_H$ ). Такая структура является основой для формирования антигенсвязывающих участков с индивидуальной, сильно варьирующей от молекулы к молекуле специфичностью. Эти участки образуются в результате комбинирования *V*-доменов *H*- и *L*-цепей. Структура остальных доменов постоянна в молекулах конкретных типов, поэтому они называются константными, или *C*-доменами. В *L*-цепях содержится один *C*-домен, в *H*-цепях - 3-4 *C*-домена. С *C*-доменами связаны функции *Ig*, которые не имеют отношения к распознаванию антигенов - взаимодействие с рецепторами клеток, активация комплемента и др. В молекулу *Ig* входят также углеводородные группировки, хотя последние непосредственно не относятся к специфической части антител. Молекулярная масса *H*-цепи - 50 000-70 000, *L*-цепи – 20 000-25 000.

Соединенные вместе, тяжелые и легкие цепи образуют базовую *Y*-образную конструкцию. Как уже было отмечено, два “плеча” *Y*-образной молекулы антитела известны как область *Fab*, что означает “фрагмент связывания антигена”,



дальний конец *Fab* - это переменная область, с которой непосредственно связывается антиген. Аминокислотная последовательность в переменной области определяет ее трехмерную структуру и, таким образом, конкретный трехмерный эпитоп антигена, с которым способна связываться эта область. Хотя эпитопная специфичность областей *Fab* идентична для каждого плеча одной молекулы антитела, эта область демонстрирует высокую степень изменчивости между антителами с различной эпитопной специфичностью. Постоянная область молекулы антитела включает в себя ствол *Y* и нижнюю часть каждого плеча *Y*. Ствол *Y* также называется областью *Fc*, что означает “фрагмент кристаллизации”, и является участком связывания фактора комплемента с фагоцитарными клетками во время опосредованной антителами опсонизации. В *Fc*-фрагменте молекул *Ig* расположены центры, ответственные за их разнообразные биологические функции: 1) фиксацию на лимфоцитах и фагоцитах; 2) связывание первого компонента системы комплемента; 3) транспорт через плаценту и другие биологические мембраны.

Существует 5 типов *H*-цепей, которые получили название  $\gamma$  (гамма),  $\alpha$  (альфа),  $\mu$  (мю),  $\epsilon$  (эпсилон),  $\delta$  (дельта) и два типа *L*-цепей  $\kappa$  (каппа) и  $\lambda$  (лямбда). У человека соотношение каппа- и лямбда- цепей в составе *Ig* составляет примерно 2:1. *H*-цепи, независимо от класса *Ig*, могут быть связаны либо с каппа-, либо с лямбда-типом *L*-цепи. В соответствии с типом *H*-цепи ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ), существует пять классов *Ig* – *G* (*IgG*), *M* (*IgM*), *A* (*IgA*), *D* (*IgD*), *E* (*IgE*). Каждый класс *Ig* обладает особыми свойствами и биологической активностью. В сыворотке *IgG* составляют 70-80% от общего количества *Ig*, *IgA* - 10-15%, *IgM* - 5-10%, *IgD* и *IgE* - около 0,2%. Наиболее изучены иммуноглобулины классов *A*, *M*, *G*, а из этих трех классов лучше всего изучены *IgG*.

По первичной структуре тяжелых цепей *IgG* делятся на 4 подкласса, а *IgM* и *IgA* – на 2 подкласса. У каждого человека одновременно могут присутствовать все классы и подклассы *Ig*, что уже само по себе (вне связи с их специфичностью относительно антигенов) обуславливает гетерогенность всей популяции *Ig*. В то же время между *L*- и *H*-цепями есть определенное сходство, очень важное для

всего комплекса иммунологических реакций – обе они имеют переменную и константную область (см. рис. 8). *Переменная область Ig* состоит из легких и тяжелых цепей, различна для разных *Ig*, и именно она отвечает за специфичность *Ig* в отношении определенного антигена. При этом принадлежность *Ig* к тому или иному классу качественно не влияет на их специфичность относительно антигенов, но степень этой специфичности различна у разных классов *Ig* – наиболее специфичны *IgG*, менее специфичны – *IgA* и еще меньше – *IgM*.

Специфичность антител определяется в равной мере их тяжелыми и легкими цепями (*Fab*-фрагментами), формирующими антигенсвязывающие участки и обусловлена первичной последовательностью расположения аминокислот в переменной области *Fab*-фрагмента, которая, собственно, и обеспечивает связь с антигеном и поэтому считается активным центром молекулы *Ig*. Зоны повышенной изменчивости аминокислот в переменных областях тяжелых и легких цепей названы *гипервариабельными участками* ("горячие точки") (см. рис. 10). Считается, что этим обеспечивается разнообразие спектра специфичности антител. Различная конформация «хвостовых» областей *H*-цепей определяет характерные свойства каждого класса и подкласса *Ig*.

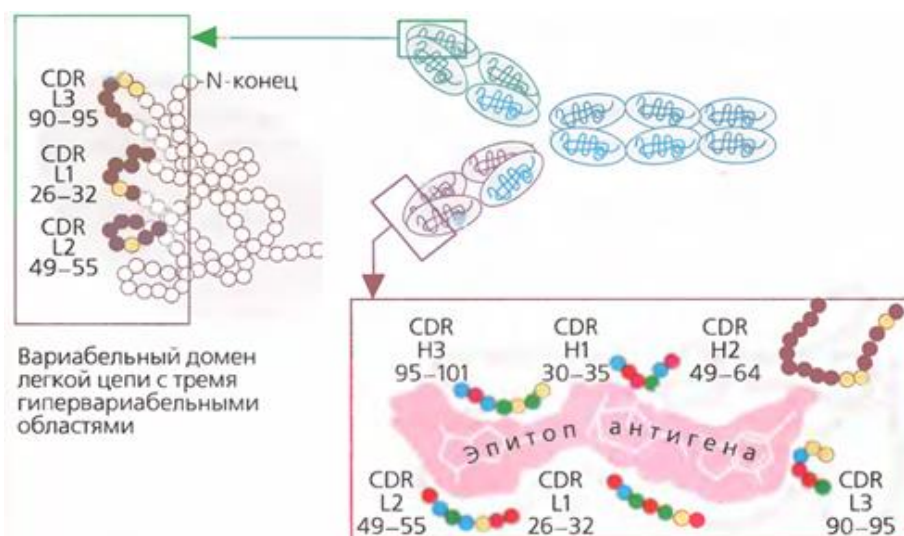


Рис. 10. Схема строения гипервариабельных областей *Ig* (по [11]).

В одной молекуле *Ig* имеются легкие цепи только одного типа, а тяжелые характерны только для одного класса (подкласса). *IgM* и полимеры *IgA* имеют дополнительную полипептидную соединяющую цепь с мол. массой 12000 – *J*-цепь (от английского joining). Разные участки молекулы *IgG* выполняют разные функции. Одни из них переменны, другие постоянны. Участки на концах цепей переменны, они по структуре отличаются у разных антител, образуя уникальные по форме полости, в которые входят соответствующие эпитопы антигенов. Эти антигенфиксирующие (эпитопфиксирующие) фрагменты, несущие иммунологическую специфичность *Ig*, называются *активными центрами антитела (паратопами или идиотопами*, см. рис. 11). Набор идиотопов на молекуле любого антитела обозначают как *идиотип*. Идиотопы могут быть построены из характерных участков *V*-областей только лишь *H*-цепей или же *L*-цепей, но в большинстве случаев в образовании идиотопа участвуют обе цепи сразу.

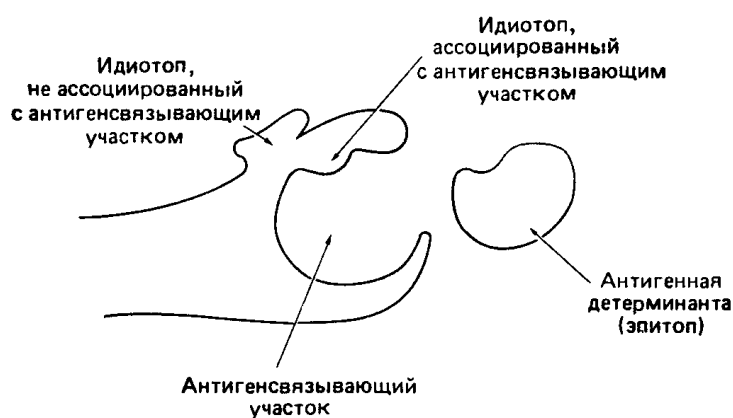


Рис. 11. Идиотопы (по [41]).

Большинство антител имеет два и более паратопа. Такие антитела называются полными. Способность антитела связывать определенное количество антигенных детерминант (эпитопов) определяется понятием *валентность*. Валентность антитела, как правило соответствует числу активных центров антитела. Молекула иммуноглобулина, связывающая два эпитопа, двухвалентна, молекула иммуноглобулина, связывающая 5 эпитопов – пентавалентна. *IgD*, *IgE* и *IgG* всегда

двухвалентны, *IgA* может быть двухвалентным (мономер) и четырехвалентным (димер, состоящий из двух мономеров), *IgM*-двухвалентным (мономер) и десятивалентным (пентамер состоит из пяти мономеров). Многовалентность антитела является необходимой предпосылкой к агрегированию антигенных частиц и их элиминации. Встречаются *Ig*, имеющие один паратоп и способные связывать только один эпитоп. Такие моновалентные антитела называются неполными, они не способны агрегировать антигенные частицы в крупные конгломераты, они лишь блокируют антигенные частицы.

Уже было отмечено, что молекулы *Ig*, как и всякие белки, сами могут быть антигенами, способными индуцировать синтез антител против своих эпитопов, специфичность которых может быть *изотипической* (отражает особенности *Ig* данного биологического вида), *аллотипической* (отражает особенности строения *Ig* конкретного индивида данного биологического вида), *идиотипической* (отражает особенности строения *Ig*, продуцируемого разными клонами клеток одного и того же индивидуума). Иногда выделяют еще *вариотипические* эпитопы антител, которые отражают наиболее общие свойства *Ig* всех классов данного вида, не зависящие от их индивидуальной или клоновой принадлежности.

Соответственно, и сами *Ig* имеют *изотипические*, *аллотипические* и *идиотипические* характеристики, причем изотипические различия *Ig* обусловлены структурой тяжелых цепей, что, как уже говорилось, позволяет выделить пять классов (изотипов) *Ig* – *M*, *G*, *A*, *E* и *D*. На этом, кстати основано выявление в крови пациентов конкретных антител с использованием меченых антител к человеческим *Ig* (см. главу 2.1.2).

Наличие аллотипов обусловлено генетическим разнообразием внутри вида, аналогично различиям людей по группам крови *A*, *B*, *O*. Изотипические и аллотипические эпитопы *Ig* локализованы в пределах константных (*C*) районов их легкой и тяжелой полипептидных цепей.







Молекулы каждого класса *Ig* могут существовать как в виде секретируемых, т.е. циркулирующих в крови и других жидкостях организма антител, так и в виде молекул, прикрепленных к клеточной мембране. В последнем случае они

служат рецепторами В-лимфоцитов. Рецепторы подавляющего большинства В-лимфоцитов относятся к *IgM* и *IgD*.

Основные свойства Ig приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Основные свойства Ig человека (по [8, 23, 58])

Параметр	Источник информации	Значения параметра для ...					
		IgG, мономер	IgA секретируемый*, димер	IgA, сывороточный, мономер	IgM, пентамер	IgD, мономер	IgE, мономер
Структура							
Число антиген связывающих мест	[58]	2	4	2	10	2	2
Прохождение через плаценту		да	нет	нет	нет	нет	нет
Связывание компонента		да	да	нет	нет	нет	нет
Молекулярная масса, тыс. дальтон	[23]	150	300	159	900	180	190
	[8]	150	400	200	900	180	200
Время циркуляции (период полужизни), сутки	[23]	21	6	6	5	3	2
	[8]	23	6	6	5	3	3
Концентрация	[23]	1100	-	250	100	3	0,01

в сыворотке, мг/100 мл	[8]	500- 1500	-	50-400	50-350	0-4	0-2
Доля от всех IgG в сыворотке, %	[8]	80	-	13	6	0,2	0,002

*Примечания: 1. «секреторный»\* - выделяемый в секрет; не следует путать с «секретируемым» - выделяемым в кровь.*

*2. Расхождение в значениях параметров связаны, по-видимому, с тем, что соответствующие данные получены с разрывом в 17 лет – в 1985 г. [23] и 2002 г. [8].*

### **1.3.2.2. Классы иммуноглобулинов**

Принадлежность *Ig* к тому или иному классу и подклассу, как уже говорилось, зависит от характерных особенностей строения константной (*C*) области *H*-цепи (количества и последовательности аминокислотных остатков, молекулярной массы, количества доменов и межцепевых дисульфидных мостиков, связывания олигосахаридов и др. свойств).

В практической иммунохимии, т.е. в практике клинических лабораторных исследований с использованием серологических методов подавляющее большинство исследований ограничено контролем наличия и/или содержания в крови *IgM* и *IgG*; но в последнее время все больший интерес проявляется к контролю наличия и содержания в крови *IgA*.

***IgG*** – основной (по его доле в общей массе *Ig*) мономерный класс *Ig* сыворотки. *IgG* доминируют в сыворотке крови при инфекционных болезнях, являясь важным противовирусным и противобактериальным фактором; особенно активны против грамотрицательных бактерий и токсинов (собственно, это единственный класс антител, нейтрализующих токсины). Относятся к поздним иммуноглобулинам, т.е. появляются в ответ на первичное введение антигена после *IgA* и *IgM* и являются главным участником вторичного иммунного ответа. *IgG* – это

единственные *Ig*, проходящие через плаценту и обеспечивающие пассивный иммунитет новорожденных до 6 месяцев. Существует 4 подкласса *IgG* – *IgG1*, *IgG2*, *IgG3* и *IgG4*, отличающихся небольшими деталями *H*-цепи *Fc*-фрагмента.

*IgM* – это макроглобулины, молекулы которых образованы пятью мономерами, аналогичными по структуре *IgG* и образующими структуру, похожую на тележное колесо (рис. 12) с *Fc*-фрагментами в центре, связанными вместе соединительными цепями. *IgM* присутствует в цитоплазме и на поверхности *B*-клеток на ранних стадиях их созревания, и это первый класс антител, продуцируемый активированными *B*-клетками во время первичного иммунного ответа. *IgM*, в основном, присутствуют в крови, в отличие от *IgG*, распределённого между кровью и тканями равномерно. *IgM* – это основной класс *Ig*, появляющихся в сыворотке крови на ранних стадиях иммунного ответа. Эволюционно старейшие антитела, лизируют антигены совместно с комплементом. *IgM* значительно активнее *IgG* по агглютинирующей и преципитирующей способности, а также по гемолитическому и опсонизирующему действию.

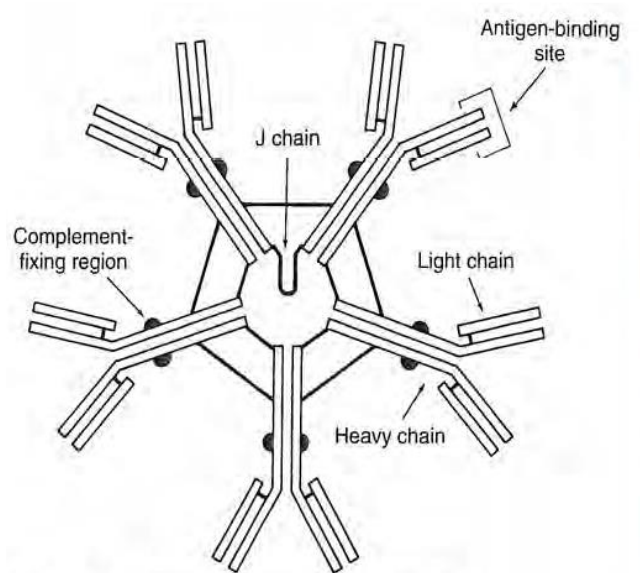


Рис. 12. Структура *IgM* (по [57]).

*IgA* - сывороточный и секреторный *Ig* (рис. 13). *IgA* - главный секреторный продукт системы лимфоидной ткани верхних и нижних дыхательных путей, урогенитального и пищеварительного трактов, фактор иммунной защиты кожных

секретов, молозива и молока. В основном *IgA*, особенно в пищеварительном тракте, имеет специальную конфигурацию, которая препятствует протеолитическому перевариванию. Такой секреторный *IgA* содержит 2 *IgA* молекулы, соединенные в комплекс специальной полипептидной цепью, и именно этот участок и называется секреторным. Предполагается, что *IgA* особенно эффективны в обеспечении местной антимикробной защиты в различных участках слизистых, препятствуя проникновению возбудителей инфекционных болезней в организм через слизистые оболочки, ингибируя колонизацию эпителия бактериями. В сыворотке крови человека в основном (на 80 %) представлен как мономер. Обеспечивает первую линию защиты.

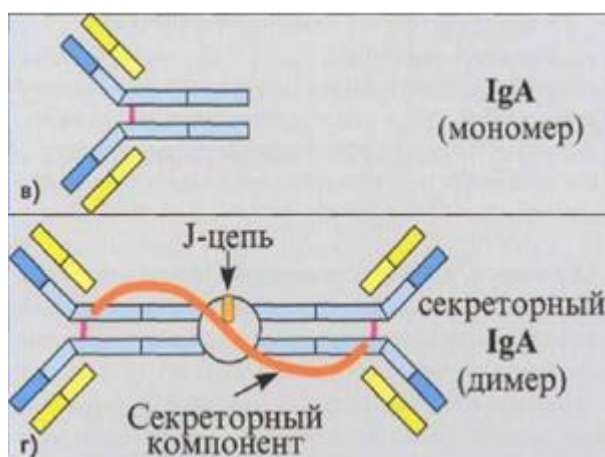


Рис. 13 Схема строения *IgA* (по [2])

*IgD* – найдены у людей, больных красной волчанкой, дифтерией, ревматизмом. Связываются с В-лимфоцитами, выполняют регулируемую функцию. Подобно *IgM*, *IgD* представляет собой мембраносвязанный мономер, обнаруженный на поверхности В-клеток, где он служит антигенсвязывающим рецептором. Однако *IgD* не секретируется В-клетками, а в сыворотке крови обнаруживаются лишь его следовые количества. Эти следовые количества, скорее всего, образуются в результате деградации старых В-клеток и высвобождения молекул *IgD* из их цитоплазматических мембран.



**IgE (реагины)** – обнаруживают при аллергиях. Эти антитела связываются с тучными клетками и базофилами, стимулируя их дегрануляцию. *IgE* – это наименее распространенный класс антител в сыворотке крови. Как и *IgG*, он секретируется в виде мономера, но его роль в адаптивном иммунитете ограничивается защитой от паразитов [22].

Более детальная характеристика классов *Ig* для целей практической иммунологии, скорее всего, не нужна, тем же, кто имеет желание узнать ее более подробно, ознакомится также с известными на сегодня деталями механизмов инициации и регулирования процессов антителообразования, можно рекомендовать изучение руководств из числа приведенных выше ссылок.

Практическое значение может иметь характеристика возможного участия конкретных классов антител в иммунологических реакциях, наблюдаемых *in vitro*. Эти данные приведены в табл. 3

Таблица 3.

Участие антител различных классов в иммунологических реакциях по [36])

Реакции	Классы Ig				
	G	M	A	E	D
Преципитация	+	+	±	-	-
Агглютинация	+	+	+	-	-
Нейтрализация токсинов	+	±	+	-	-
Нейтрализация вирусов	+	+	+	-	±
Лизис бактерий	+	+	+	-	-
Связывание комплемента	+	+	±	-	±

*Примечания:* «+» – *Ig* участвует в реакции; «-» – не участвует; «±» – точно не установлено

### 1.3.2.3. Динамика антителообразования

Способность к образованию антител появляется во внутриутробном периоде уже у 20-недельного эмбриона; но реализуется она, как правило, лишь после рождения.

Динамика антителообразования зависит от дозы антигена и частоты его воздействия, а также от состояния организма и его ИС. При первичном и повторном введении антигена динамика антителообразования также различна и протекает в несколько стадий.

Выделяют латентную, логарифмическую, стационарную фазу и фазу снижения. В латентной фазе происходят переработка и представление антигена иммунокомпетентным клеткам, размножение клона клеток, инициированных вырабатывать антитела к данному антигену, и начинается синтез антител. В этот период антитела в крови еще не обнаруживаются. В логарифмической фазе синтезированные антитела поступают в лимфу и кровь. В стационарной фазе их содержание достигает максимума и может на некоторое время стабилизироваться, а затем наступает фаза снижения.

При первичном введении антигена латентная фаза составляет, как правило, 3-5 суток, логарифмическая - 7- 15 суток, стационарная - 15-30 суток и фаза снижения - 1-6 месяцев и более. Конкретная динамика образования *Ig* разных классов также не одинакова. Первоначально синтезируются *IgM* и *IgA*, а затем *IgG*.

Если циклы образования *IgM* и *IgA* завершаются практическим исчезновением этих антител из крови в последней фазе, то *IgG* могут в достаточно высоких титрах обнаруживаться еще длительное время, а в ряде случаев и в течение всей жизни (см. рис. 14)

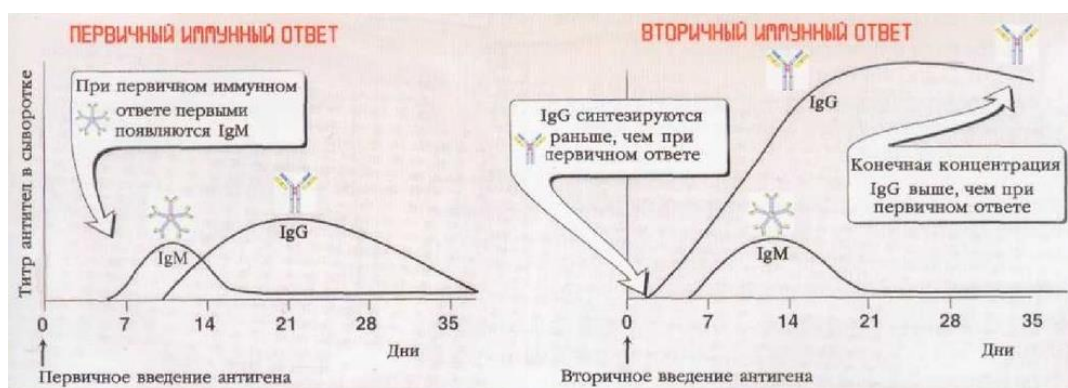


Рис. 14. Динамика образования *IgM* и *IgG* при первичном и вторичном контакте с антигеном (по [2])

В отличие от первичного иммунного ответа при вторичном введении антигена латентный период укорачивается до нескольких часов или 1-2 суток, логарифмическая фаза характеризуется быстрым нарастанием и значительно более высоким уровнем антител, который в последующих фазах длительно удерживается и медленно, иногда в течение нескольких лет, снижается. При вторичном иммунном ответе, хотя стимулируется образование и *IgA*, и *IgM*, и *IgG*, но в отличие от первичного синтезируются главным образом *IgG*.

Как уже отмечалось, при некоторых инфекциях антитела к возбудителю присутствуют в крови на протяжении десятилетий. Вместе с тем полупериод жизни самого устойчивого иммуноглобулина составляет в среднем 25 дней, следовательно, длительное присутствие *IgG* в крови есть следствие постоянного ресинтеза этого иммуноглобулина.

Определение антител различных классов в сыворотке крови имеет важное значение не только для диагностики конкретной инфекции, но и для оценки ее стадии. Так, наличие *IgM* и/или *IgA* свидетельствует об острой фазе инфекции, а наличие *IgG* при отсутствии *IgM* и *IgA* – это, как правило, анамнестическое свидетельство перенесенной инфекции или вакцинации.

Очень быстрое и энергичное антителообразование при повторной встрече с антигеном используется в практических целях при необходимости получения высоких титров антител при производстве диагностических и лечебных сывороток от иммунизированных животных. При этом максимальный синтез антител

(гипериммунизация) наблюдается после неоднократного повторного введения антигена с соблюдением определенного интервала, что важно учитывать при выборе оптимальных схем иммунизации продуцентов в процессах производства соответствующих диагностических препаратов, о чем пойдет речь уже во второй части пособия.

При этом хотелось бы обратить внимание на неправомерность нередкого использования термина «вакцинация» (соответственно, термина «вакцина») для наименования операций, связанных с иммунизацией животных-доноров в производствах соответствующих лечебных и диагностических препаратов. «Вакцинация» и «вакцина» как по происхождению терминов, так и по назначению соответствующей процедуры и используемого при ней препарата имеют отношение только к профилактике определенной патологии, т.е. к защите вакцинируемого. Естественно, что в процессе получения гипериммунных сывороток от животных-продуцентов ни о какой их защите речь не идет, тем более что во многих случаях соответствующие процедуры необходимо заканчиваются смертью продуцента. Поэтому термины «вакцина» и «вакцинация» здесь просто неуместны.

#### ***1.3.2.4. Моноклональные антитела***

Поскольку пул антител, вырабатываемых в естественном иммунном процессе, является продуктом деятельности нескольких клонов клеток-продуцентов антител, каждый из которых вырабатывает *Ig* только одной специфичности, то он всегда содержит все многообразие классов (подклассов) и типов антител, т.е. антитела, вырабатываемые при этом всегда *поликлональны*. В иммунохимических же исследованиях это многообразие чаще всего является досадной помехой, снижающей чувствительность и специфичность используемых диагностических тестов. Устранить ее удалось с появлением метода получения *моноклональных антител* (МКА), т.е. метода клеточных гибридом.

В основу метода получения МКА положена способность нормальных плазматических клеток сливаться с перевиваемыми опухолевыми клетками (миеломные клетки – злокачественно перерожденные В-лимфоциты, плазмоцитомы). При слиянии образуется популяция гибридных клеток (гибридом), получивших от плазматических клеток способность вырабатывать специфические антитела одного класса и типа, а от миеломных – способность к неограниченному росту. Все существующие на сегодня модификации метода сводятся в целом к следующему (см. рис. 15):

- иммунизация животных;
- слияние иммунных лимфоцитов животных с миеломными клетками;
- селекция гибридом;
- наращивание клонов гибридом и скрининг их на способность продуцировать специфические антитела;
- клонирование гибридом и наращивание клонов гибридом в культуре и в организме сингенных мышей.

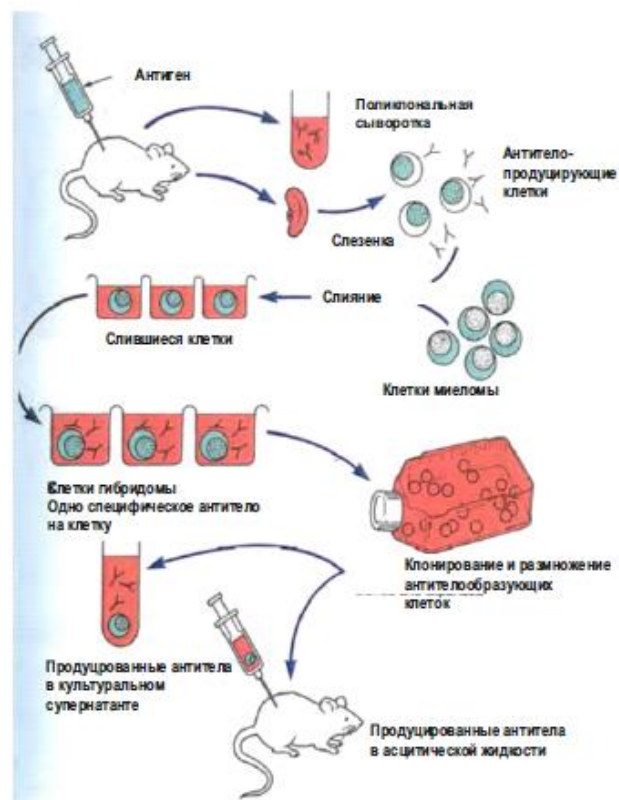


Рис. 15. Схема получения моноклональных антител (по [57]).

Для слияния клеток используют полиэтиленгликоль (ПЭГ), который позволяет существенно увеличить частоту слияний. Неслившиеся лимфоциты отмирают через несколько дней после гибридизации. Отделение неслившихся плазматомных клеток от гибридов проводят на селективной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин, в присутствии которых клетки плазматомы не способны делиться и отмирают. После размножения клеток проводится оценка клона на способность продуцировать антитела нужного класса и определенной специфичности. Выявленные нужные антителопродуцирующие клоны гибридных клеток отбирают и реклонировывают. Гибридный клон может быть легко размножен до нужных размеров, а синтезируемые им антитела можно получать в необходимых количествах *in vitro* и *in vivo*.

\*\*\*

#### *Контрольные вопросы*

1. *Что такое гуморальный иммунитет, основные гуморальные элементы иммунной системы?*
2. *Комплемент и пути его активации?*
3. *Антигены, как активаторы иммунного ответа?*
4. *Основные характеристики антигенов?*
5. *Антигены и гаптены?*
6. *Строение антигенов? Что определяет специфичность антигенов?*
7. *Виды антигенной специфичности?*
8. *Что такое антитела?*
9. *Строение антител?*
10. *Классы антител?*
11. *Динамика антителообразования?*
12. *Поликлональные и моноклональные антитела?*

## 1.4. Имму́нный отве́т

[2, 8, 22, 23, 26, 35, 36, 45, 52, 54, 58]

Иммунный ответ – это распознавание потенциального патогена (возбудителя или иного чужеродного материала) и развертывание цепи реакций, направленных на его устранение.

Основные этапы развития специфического иммунного ответа:

- первичное проникновение патогена через барьерные ткани (кожу и слизистые оболочки);
- захват патогена или его фрагментов антигенпрезентирующими клетками (АПК), которые могут быть локализованы в барьерных тканях (клетки Лангерганса, дендритные клетки, *M*-клетки кишечника и т.д) или в лимфе, собранной из тканей в лимфатическом узле (*B*-лимфоциты);
- *процессинг* (преобразование антигена в форму, распознаваемую лимфоцитами) и доставка антигенов к *T*-лимфоцитам периферических лимфоидных органов АПК, активированными антигеном;
- *презентация* антигенов патогена (процесс, при котором определенные клетки иммунной системы демонстрируют антигенные пептиды в своей клеточной мембране) *T*-лимфоцитам;
- развитие специфического ответа.

### *1.4.1. Судьба антигена при его введении в организм*

При местном введении антигена с ним прежде всего начинают взаимодействовать АПК, развивается местная воспалительная реакция. Здесь фиксируется примерно 20% введенного белкового антигена и начинается процесс его расщепления и презентации клеткам ИС.

Вторая ступень - регионарные лимфатические узлы. Незафиксированная в макрофагах часть антигена поступает через лимфатические сосуды в регионар-

ные лимфатические узлы, затем в грудной проток и кровь. В регионарных лимфоузлах продолжается процесс расщепления антигена и взаимодействия с элементами ИС.

Третья ступень - фиксация антигена в селезенке, печени и других органах, в которых происходит тот же процесс переработки и презентации антигена.

При внутривенном введении корпускулярного антигена он исчезает из кровотока уже через несколько часов. Растворимые антигены могут быть обнаружены в крови значительно позже – до нескольких суток, при этом время обнаружения определяется введенной дозой антигена, его молекулярной массой и структурными особенностями.

Из лимфы и крови антиген попадает в селезенку, печень и костный мозг, при чем процесс элиминации наблюдается при введении не только гетерологичных субстанций, но и гомологичных, хотя гетерологичные элиминируются значительно быстрее. После этого наступает фаза равновесия концентрации антигена в крови и органах. Антиген, поступивший в селезенку или печень, может находиться там в течение недель и даже месяцев.

Иначе говоря, при местном введении корпускулярного антигена он вначале попадает в афферентные (приносящие, центростремительные) лимфатические протоки, где контактирует с Т-лимфоцитами, а затем – в региональный лимфатический узел, где встречается уже с В-лимфоцитами. То же самое происходит при внутривенном введении корпускулярного антигена. Вне лимфатических узлов корпускулярные антигены, находящиеся в крови, могут также фиксироваться на поверхности макрофагов и оседать в печени, почках, селезенке, легких, но иммунный ответ стимулирует только та его часть, которая фиксируется макрофагами селезенки.

При введении растворимых белковых антигенов макрофаги захватывают лишь несколько процентов от введенного белка – ту часть, которая представлена спонтанно возникшими агрегатами. Оставшаяся часть захватывается макрофагами уже после появления в крови специфических антител и соединения с ними.



Функции антител в иммунном ответе – это нейтрализация патогенов за счет связывания *IgG*, *IgM* или *IgA* с эпитопами их поверхностных антигенов, предотвращающее прикрепление патогенов к клеткам организма (рис. 16), опсонизация (покрытие патогена молекулами, такими как *IgG*, факторы комплемента, *C*-реактивный белок и сывороточный амилоид *A*), для содействия связыванию с фагоцитами и облегчения фагоцитоза корпускулярных антигенов (рис. 17), агглютинация (перекрестное связывание патогенов антителами с образованием крупных агрегатов, которые легче отфильтровываются из крови почками и селезенкой и легче фагоцитируются с последующим уничтожением (рис. 18), активация системы комплемента (за счет этого стимуляция воспалительной реакции, привлечение фагоцитов, усиление фагоцитоза и лизис бактериальных клеток).

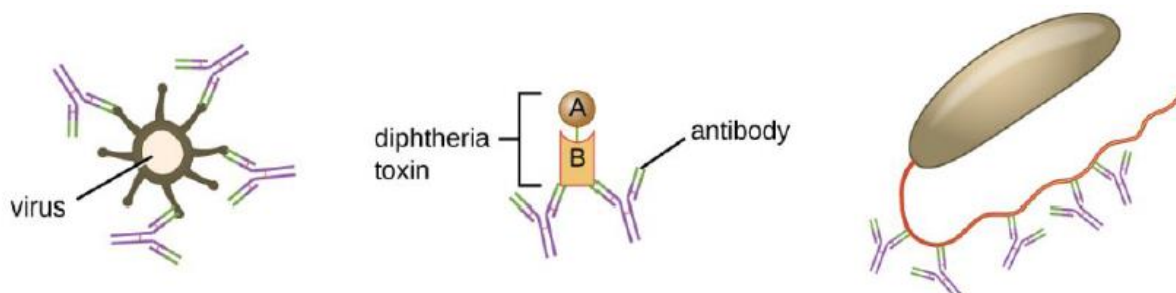


Рис. 16. Нейтрализация патогенов антителами (по [58]).

Нейтрализация включает связывание специфических антител с антигенами, обнаруженными на бактериях, вирусах и токсинах, предотвращая их прикрепление к клеткам-мишеням

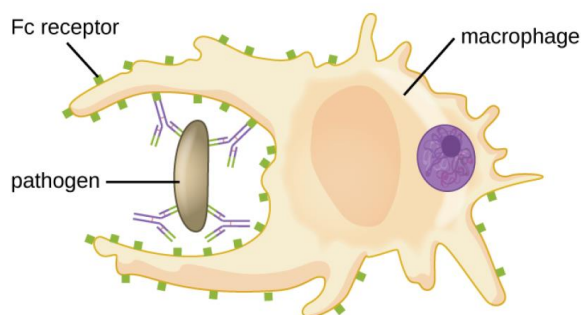


Рис. 17. Опсонизация корпускулярного антигена антителами (по [58])

Антитела служат в качестве опсонин и подавляют инфекцию, помечая патогены для уничтожения макрофагами, дендритными клетками и нейтрофилами. Эти фагоцитарные клетки используют *Fc*-рецепторы для связывания с *IgG*-опсонизированными патогенами и инициируют первую стадию прикрепления перед фагоцитозом

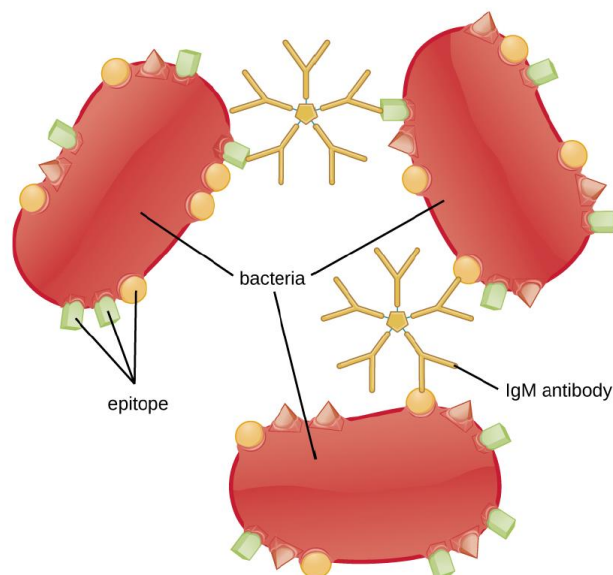


Рис. 18 Агглютинация корпускулярных антигенов (по [58]).

Антитела, особенно *IgM*, агглютинируют бактерии путем связывания с эпитопами двух или более бактерий одновременно. При наличии нескольких патогенов и антител образуются агрегаты, когда сайты связывания антител связываются с отдельными патогенами.

#### ***1.4.2. Фазы взаимодействия антигена и антитела in vivo***

Взаимодействие (реакция) антигена и антитела *in vivo* имеет две фазы – специфическую и неспецифическую.

Первая – это собственно взаимодействие их молекул с образованием иммунного комплекса (ИК); оно длится обычно несколько секунд или минут. В основе этой реакции лежит структурная комплементарность паратопа антитела эпитопу антигена, что позволяет иммунологам сравнивать взаимодействие антитела с антигеном с принципом ключа и замка. Анализ взаимодействия антигена

и антитела показал, что антитела распознают не определённую структуру антигена, а характер его поверхности, его внешний образ, определяемый как его структурой, так и природой функциональных радикалов, т.е. антиген распознаётся по трехмерной форме наружного электронного облака.

Вторая (фаза проявления) характеризуется внешними признаками образования ИК (образование решетки или сетей) и может длиться от нескольких минут до нескольких часов. При этом необходимым условием ее реализации является наличие более трех эпитопов на каждую молекулу антигена и по два паратопа на каждую молекулу.

Образование ИК — один из компонентов нормального иммунного ответа. Формирование, "судьба" и биологическая активность ИК зависят от многих факторов, и, прежде всего, от природы антител и антигена, входящих в состав ИК, а также от их соотношения.

Все это определяет такие характеристики ИК как *аффинность* (*аффинитет*) и *авидность*. Хотя и *аффинность*, и *авидность* принято рассматривать как характеристики антигенов и антител, все же корректней анализировать их именно как характеристики ИК, поскольку безотносительно взаимодействия конкретного антигена с конкретным антителом они теряют всякий смысл.

С учетом этого можно так определить указанные характеристики.

*Аффинитет* (*аффинность*) — это степень соответствия пространственных конфигураций конкретного эпитопа и конкретного паратопа, определяющая прочность связи между ними. Чем больше это соответствие, тем интенсивнее нековалентные силы между ними (гидрофобные, электростатичные и др.), и тем выше аффинитет связи конкретного эпитопа с конкретным паратопом.

*Авидность* — это сила, с которой связываются в ИК молекулы антигена и антитела с учетом числа соединившихся эпитопов и паратопов, т.е. валентности антигена и антитела и аффинности каждой соединившейся пары, т.е. это итоговая характеристика стабильности ИК.

Очевидно, что avidность ИК одного и того же антигена с разными классами Ig будет значительно различаться даже при равной аффинности соответствующих множеств пар «эпитоп-паратоп», и avidность такого ИК с IgM всегда будет самой высокой. Кроме того, avidность ИК одного и того же антигена с Ig любого класса в ходе иммунизации вначале минимальна, но затем постоянно растет за счет постоянного увеличения аффинитета пар «эпитоп-паратоп» данного ИК. Эти обстоятельства являются одной из причин использования многократной иммунизации животных доноров для получения сыворотки крови, которая содержит необходимый Ig не только в максимально возможной концентрации, но и с максимально возможным соответствием его паратопов эпитопам антигена (антигенов), используемых для иммунизации.

Кстати говоря, avidность ИК прямо определяет специфичность иммунологических тестов, которые основаны на регистрации образования ИК *in vitro* – чем она ниже, тем ниже специфичность теста, т.е. чем ниже avidность комплекса, тем вероятнее ложноположительные результаты диагностического исследования по причине перекрестных реакций «антиген-антитело».

Известно, что при высокой степени очистки антигена его иммуногенная активность уменьшается. Стремление создать вакцины из высоко очищенных гомотогенных антигенов привело к необходимости применения *адьювантов*, т.е. веществ, неспецифически усиливающих иммунный ответ на антигены. И хотя для практики иммунохимической диагностики важна не иммуногенность антигена, а его антигенность, т.е. способность инициировать антителообразование вне зависимости от защитного эффекта образующихся антител, при получении гипериммунных диагностических сывороток, так же как и при профилактической вакцинации, показано применение адьювантов.

Нет универсальных адьювантов, ими могут быть минеральные вещества, вещества растительного и микробного происхождения, синтетические вещества.

Механизмы действия адьювантов могут включать:

- создание «депо» антигена, замедление его всасывания;
- усиление воспалительной реакции;

- усиление реакции со стороны лимфатических узлов;
- изменение физико-химических свойств антигена;
- усиление синтеза белков;
- активацию системы комплемента;
- усиление процессинга и презентации антигена Т-клеткам;
- усиление функции вспомогательных клеток;
- ускорение транспорта антигена к иммунокомпетентным клеткам;
- стимуляцию пролиферации, дифференцировки и функциональной активности Т- и В-клеток и их взаимодействия;
- стимуляцию образования цитокинов.

В зависимости от особенностей конкретного адъюванта он может стимулировать или гуморальный, или клеточный иммунитет, или оба типа иммунного ответа.

\*\*\*

### *Контрольные вопросы*

1. *Что такое иммунный ответ и его основные этапы?*
2. *Что происходит с антигеном in vivo?*
3. *Каковы функции антител в иммунном ответе?*
4. *Фазы взаимодействия антигена и антитела in vivo?*
5. *Что такое аффинность и авидность?*
6. *Что такое адъюванты и для чего они используются в практической иммунохимии?*

## 2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ИММУНОХИМИЯ – ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

### 2.1. Задачи иммунохимической диагностики

[2, 9, 5, 19, 25, 27, 35, 36, 38, 40, 53]

Изучение той части иммунного ответа, которая связана с выработкой специфических Ig к антигенам инфекционных и неинфекционных патогенов, позволило разработать и внедрить в практику КЛД многочисленные иммунохимические тесты, основанные на регистрации феноменов, наблюдаемых при проведении реакции «антиген-антитело» *in vitro*.

Иммунохимическая диагностика решает две основные задачи – *сероидентификация*, т.е. идентификация антигена (чаще всего речь идет об идентификации возбудителя инфекции) с использованием иммунных диагностических сывороток и *серодиагностика*, т.е. установление самого факта взаимодействия организма пациента с конкретным антигеном (чаще всего это, опять-таки, диагностика текущего инфекционного процесса или его наличия в анамнезе по выявлению антител к возбудителю) с использованием диагностикумов – реагентов, содержащих соответствующие антигены.

В табл. 4 приведена классификация реакций антиген-антитело *in vitro* в зависимости от их компонентов и условий среды.

Таблица 4.

Классификация серологических реакций *in vitro* в зависимости от участвующих компонентов и условий среды (по [38])

Тип реакции	Особенности антигена, его величина	Неспецифические компоненты реакции
<i>Реакции 1-го порядка – двухкомпонентные ИК (АГ+АТ)</i>		
Агглютинация	Бактерии	Электролиты (изотонический
Гемагглютинация	Эритроциты	
	Корпускулы, крупные	

		частицы	раствор)
Преципитация Нейтрализация	Белки, экстракты органов и тканей, лизаты, гаптены, токсины, вирусы	Молекулы, растворимые в электролите	Электролиты (изотонический раствор)
<i>Реакции 2-го порядка – трехкомпонентные ИК (АГ+АТ+К<sub>о</sub>)</i>			
Реакции иммунного лизиса: бактерио- лиз, гемолиз, цитолиз	Бактерии, эритроциты, другие клетки	Клетки	Электролиты (изотонический раствор) и комплемент
Реакция связывания комплемента (РСК)	Гаптены, экстракты, лизаты, полные антигены, клетки	Любого размера	Электролиты (изотонический раствор) и комплемент

Достоинства иммунологического исследования – высокая специфичность и высокая чувствительность; возможность проведения ретроспективных эпидемиологических исследований на основании обнаружения антител; быстрота получения результатов. В большинстве своем серологические реакции просты в проведении, регистрации и учете результатов, доступны широкому кругу лабораторий, как правило, безопасны, экономичны, поддаются стандартизации.

Но при этом следует учитывать, что для получения исследуемого образца для серодиагностики нужно взять у пациента кровь, т.е. ни много ни мало произвести парентеральное вмешательство в его организм. Кроме того, прямым доказательством наличия в организме пациента искомого антигена может быть только выявление его в исследуемом образце, поскольку выявление в образце антител к нему не является доказательством наличия этого антигена в организме пациента на момент исследования – оно может быть результатом уже завершившегося процесса взаимодействия, либо просто результатом соответствующей вакцинации.

Следует учитывать также динамику антителообразования, т.е. сроки появления в крови антител в обнаруживаемых концентрациях (титрах).

Наибольшую ценность иммунохимические методы имеют в тех случаях, когда выделить возбудитель не представляется возможным, но можно определить наличие его антигенов и/или антител к ним с использованием *диагностических гипериммунных сывороток* и *диагностикумов* (более детальная характеристика указанных реагентов дана в конце подраздела 2.2.1.1).

Ряд общих характеристик серологических исследований, которые, по нашему мнению, необходимо учитывать при их организации и проведении, а также знать специалистам, занятым материальным обеспечением таких исследований, приведен Т.Р. Романовской и М.Ю. Юркевич в учебном пособии «Инфекционная иммунология» [53].

Так, во-первых, если анализом являются специфические антитела к какому-то антигену, исследователь должен располагать набором стандартных образцов этого антигена, а если анализом являются какие-то антигены, то необходим набор диагностических сывороток, заведомо содержащих антитела к этим антигенам. Во-вторых, взаимодействие антигена и антитела осуществляется только в присутствии электролита, в качестве которого обычно используют изотонический раствор хлорида натрия или буферные смеси (рН реакционной смеси должен быть около 7,3). В-третьих, для образования комплекса антиген-антитело требуется период инкубации при температуре от 4 °С до 37 °С, причем само образование специфического иммунного комплекса происходит быстро, а образование визуально различимого феномена (агглютинации, лизиса и др.) завершается медленно (в течение нескольких часов или даже суток). И, в-четвертых, оба компонента серологической реакции (антиген и антитела) должны присутствовать в эквивалентном соотношении, поскольку избыток одного из компонентов блокирует образование комплекса антиген-антитело, что способствует получению ложноотрицательного результата.



Кроме того, при оценке результатов серологического исследования часто возникает необходимость отличить специфическую реакцию (на видовые и типовые антигены) от группоспецифической (на межвидовые антигены), а иммунный ответ на текущую инфекцию – от анамнестического иммунного ответа на перенесенное ранее заболевание или вакцинацию. В первом случае дифференциация основывается на использовании монодиагностикомов, скорости нарастания титра антител, которая выше к специфическим антигенам, реакции адсорбции антител избытком антигена, легкости диссоциации иммунного комплекса под влиянием диссоциирующих факторов. Во втором случае для дифференциации, как и в первом случае, применяют темпы нарастания титра антител, которые выше при текущей инфекции, а также особенности проявления реакции и классов иммуноглобулинов, сопоставление результатов серологического метода с бактериологическими и клиническими данными.

Образование комплекса антиген-антитело может сопровождаться такими феноменами, как *агглютинация, преципитация, лизис*, что в зависимости от интенсивности этих проявлений позволяет визуальную регистрацию результатов исследования как невооруженным глазом, так и с использованием лупы или агглютинометра. Если при взаимодействии антигена и антител к нему указанные феномены не наблюдаются, наличие комплекса антиген-антитело может быть выявлено за счет специальных (флуоресцентных, радиоизотопных, ферментных) меток или антигена, или антитела, или еще одного реагента – конъюгата антитела или антигена с указанными метками, который связывается уже с образовавшимся иммунным комплексом; результат исследования регистрируется при этом с помощью специальной аппаратуры по изменениям параметров реакционной среды.

И, наконец, этими же авторами выделены следующие этапы серологического исследования:

1) получение исследуемого образца – в большинстве случаев это сыворотка крови, но материалом для исследования могут служить также ликвор, моча, фильтрат испражнений, промывные воды бронхов, полости рта, глотки, носа и т. д.;

2) выбор серологической реакции для исследования образца; выбор определяется целью исследования, предполагаемым заболеванием, фазой болезни, материалом для исследования, чувствительности реакции, возможностей конкретной лаборатории. Для выявления АТ, а также АГ используют реакции агглютинации (РА), пассивной гемагглютинации (РПГА), иммунофлюоресценции (РИФ), торможения гемагглютинации (РТГА), преципитации, флоккуляции, реакцию связывания комплемента (РСК) и др.

3) постановка серологической реакции,

4) регистрация серологической реакции с целью определения присутствия серологических маркеров инфекции.

По нашему мнению, указанные авторы несколько заузили рамки применения серологических методов, поскольку они могут применяться не только при диагностике патологических процессов и состояний после них, но также при диагностике ряда физиологических состояний, например, те же определения группы крови, диагностика беременности.

Кроме того, последовательность этапов должна быть несколько иной – так, выбор серологической реакции все же должен делаться до забора крови у пациента, а не после. Т.е. последовательность действий, с нашей точки зрения, должна быть следующей – на основании ранее выставленного предварительного или окончательного диагноза формулируется цель исследования (получение информации для подтверждения или постановки окончательного диагноза при оценке как физиологического состояния в ходе профилактических мероприятий, так и при подозрении на наличие патологии, а также для оценки состояния пациента с уже известным диагнозом при выборе необходимых лечебно-профилактических мероприятий или в процессе их проведения), после чего выбирается метод исследования, адекватный его цели и возможностям лаборатории, отбираются необходимые образцы, ставится соответствующая серологическая реакция, ее результаты регистрируются и интерпретируются в обязательном соответствии со всей прочей информацией о состоянии обследуемого.

В настоящее время в лабораторных иммунохимических исследованиях используют следующие реакции:

- реакция агглютинации,
- реакция преципитации,
- реакция связывания комплемента,
- реакция пассивной гемагглютинации,
- реакция иммунофлуоресценции,
- реакция коагглютинации,
- иммуноферментный анализ,
- радиоиммунный анализ,
- иммуноблоттинг,
- иммунохроматографический анализ.

В табл. 5 приведены показатели чувствительности (минимальные определяемые концентрации аналитов) всех этих реакций, кроме иммунохроматографии.

Таблица 5.

Чувствительность серологических реакций (по [2])

Наименование реакции	Чувствительность (г/мл)
Реакция преципитации	$10^{-4} - 10^{-6}$
Реакция агглютинации	$10^{-6} - 10^{-7}$
Реакция связывания комплемента	$10^{-6}$
Реакция пассивной гемагглютинации	$10^{-7} - 10^{-9}$
Реакция иммунофлуоресценции	$10^{-7}$
Реакция коагглютинации	$10^{-8} - 10^{-9}$
Имуноферментный анализ	$10^{-6} - 10^{-7}$
Радиоиммунный анализ	$10^{-9}$ и менее
Имуноблоттинг	$10^{-7} - 10^{-9}$

Следует отметить, что иммунохимическая диагностика наиболее эффективна при проведении соответствующих реакций в зоне эквивалентности, т.е. области оптимальных соотношений концентраций антигена и антител, когда в реакционной среде после образования иммунных комплексов не обнаруживаются ни свободные антигены, ни свободные антитела.

In vitro взаимодействие антиген-антитело исследуют на двух уровнях – первичном и вторичном. В первом случае констатируют лишь сам факт образования иммунного комплекса. Это можно сделать, если антиген или антитело мечены подходящим маркером. Такие анализы отличаются максимальной чувствительностью. Вторичный уровень характеризуется внешними (видимыми) проявлениями реакции. Они требуют для своего воспроизведения более высокой концентрации ингредиентов (антигенов и антител), т.е. менее чувствительны.

Стоит, наверное, указать, что вряд ли следует искать однозначные параллели между многочисленными внешними проявлениями взаимодействия антиген-антитело in vitro и тем, что происходит при аналогичных взаимодействиях in vivo. Но даже, если такие параллели, в принципе, невозможны, на значимости иммунохимической лабораторной диагностики это нисколько не сказывается, и соответствующие серологические исследования – *иммунодиагностические реакции* широко используются и будут использоваться во всех разделах медицины.

#### *Контрольные вопросы*

- 1. Какие задачи решает иммунохимическая диагностика?*
- 2. Особенности и этапы иммунохимических исследований?*
- 3. Виды реакций антиген-антитело, используемых в иммунохимической диагностике?*

## 2.2. Реакции взаимодействия антигенов и антител *in vitro*

[13, 16, 18, 22, 25, 26, 35, 38, 40, 46, 50, 51, 53]

### 2.2.1. Иммунодиагностические реакции без использования меченых реагентов

#### 2.2.1.1. Реакция агглютинации

Наиболее простой техникой, ранее всего (с начала XX века) использованной в КЛД и до сих пор наиболее часто применяемой реакцией следует считать *реакцию агглютинации* (РА, от лат. *agglutinatio* — склеивание) —, т.е. склеивание корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов или других клеток, нерастворимых частиц с адсорбированными на них антигенами, а также макромолекулярных агрегатов), в результате их взаимодействия со специфическими антителами, проявляющееся образованием в реакционной среде видимого (плотного или хлопьевидного) осадка — агглютината (рис. 19) Ее основные преимущества — простота постановки и возможность визуального учета невооруженным глазом, однако чувствительность реакции относительно невысока.

Варианты РА — прямая (активная) и непрямая (пассивная) РА, РА на стекле (ориентировочная или пластинчатая) и пробирочная (развернутая), объемная и капельная РА, количественная и качественная РА, обычная и ускоренная (экспрессная) РА.

##### 2.2.1.1.1. Прямая реакция агглютинации

Прямая или активная РА — это непосредственное взаимодействие антигена и соответствующего антитела.

Самый простой способ постановки прямой РА — реакция на стекле.

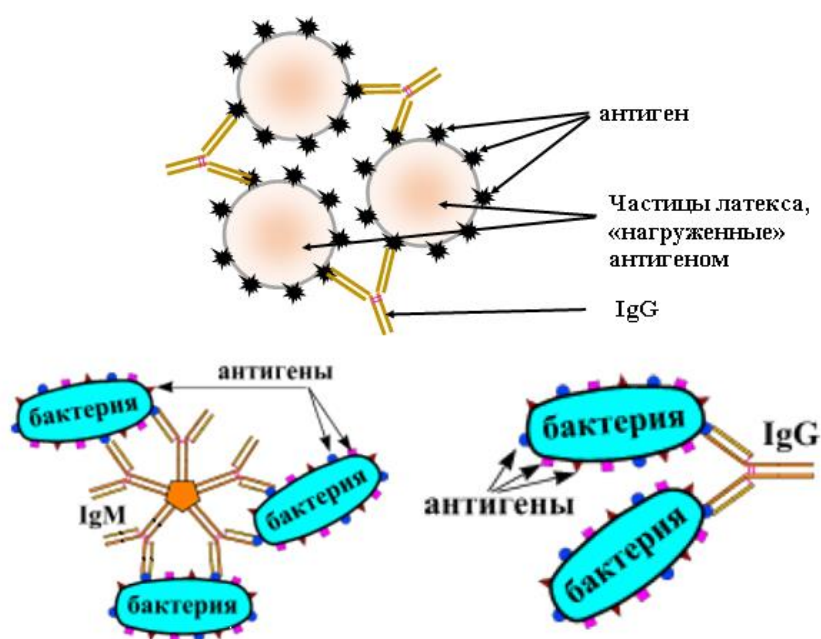


Рис. 19. Схема реакции агглютинации (по [38]).

Если анализом является антиген, на предметное стекло (или иную стеклянную пластинку) наносится капля диагностической сыворотки (обычно в разведении 1:10 или 1:20, что обязательно указывается в инструкции по ее применению) и в нее вносят каплю исследуемого образца (например, бактериальной культуры, выделенной от пациента). Если анализом являются антитела (исследуется сыворотка крови пациента) на стекло наносится капля соответствующего антигенного диагностикума и в нее добавляется капля исследуемой сыворотки. Параллельно в обязательном порядке ставится контроль – вместо диагностической сыворотки или диагностикума на стекло наносится капля физиологического раствора. После экспозиции (время и условия указываются в инструкциях по применению диагностической сыворотки или диагностикума) результат постановки учитывается визуально, лучше всего на темном фоне при боковой подсветке. Положительной реакцией считается появление осадка в капле сыворотки или диагностикума при сохранении гомогенности взвеси в контрольной капле (см. рис. 20).

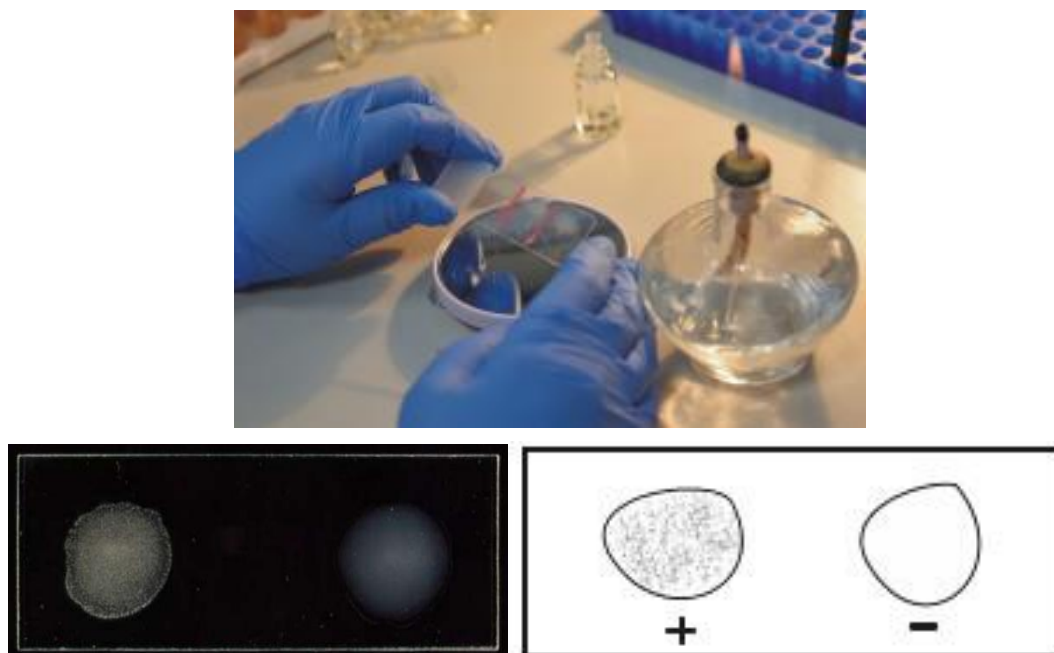


Рис. 20. Ориентировочная РА на стекле

В зависимости от природы бактериального антигена ( $O^6$ -антиген или  $H^7$ -антиген) различают  $O$ -агглютинацию и  $H$ -агглютинацию.

Соматические  $O$ -антигены термостабильные и выдерживают кипячение в течение 2 часов. При взаимодействии с антителами в бактериальной взвеси образуются мелкие плотные зерна.

$H$ -антигены (жгутиковые) термолабильные, быстро разрушаются при  $100^{\circ}\text{C}$ , а также под действием этанола. В реакциях с  $H$ -антисывороткой образуются рыхлые крупные хлопья бактерий, связанных посредством антител, прикрепившихся к жгутикам (рис. 21).

При определении антител в сыворотке крови с помощью известных антигенов можно использовать  $O$ -диагностикум и  $H$ -диагностикум.  $O$ -диагностикум представляет собой взвесь бактерий, убитых нагреванием.  $H$ -диагностикум представляет собой взвесь бактерий, убитых формалином (при обработке формалином  $H$ -антиген не разрушается). От вида антигена и антител зависит не только характер, но и скорость РА, так,  $H$ -агглютинация происходит быстрее  $O$ -агглютинации.

<sup>6</sup> (от нем. *Ohne Nauch* – не образующие налета на агаре)

<sup>7</sup> «Н» - латинская буква, почему именно «Н-антиген» по ссылкам в Интернете установить не удалось



Рис. 21. О-агглютинация (а) и Н-агглютинация (б) (по [25]).

Поскольку идентификация антигенов связана обычно с необходимостью выбора из достаточно большого числа подлежащих идентификации вариантов, вначале проводят РА на стекле с поливалентными диагностическими сыворотками, при положительном результате продолжают исследование уже с групповыми диагностическими сыворотками, а затем, получив положительный результат с одной из использованных групповых сывороток, переходят к определению типа антигена с использованием уже моновалентных диагностических сывороток.

РА на стекле, как правило, используется при альтернативном учете результатов реакции (по принципу «да»-«нет» - «есть антитела»-«нет антител», «антиген данного типа присутствует в образце»-«антиген данного типа отсутствует в образце»), однако при необходимости с ее помощью можно определять и титры анализов в образцах, т.е. максимальные разведения образцов, в которых еще выявляется анализ, хотя более точно это может быть выполнено в пробирочном варианте РА, которая, как РА на стекле, может использоваться и для определения наличия и/или содержания (титров) антител в сыворотке крови, и для определения (идентификации) антигенов (возбудителя). Однако, чаще всего, развернутую РА используют все же для определения титра антител.

Для определения антител и их титров в сыворотке крови больного развернутую РА проводят следующим образом. К серии разведений сыворотки крови



добавляют антигенный диагностикум (взвесь известных убитых микроорганизмов или частицы с сорбированными на них известными антигенами). Пробирки помещают на 2 часа в термостат при температуре 37°C. Реакция может протекать с образованием мелких хлопьев, невидимых невооруженным глазом, поэтому учет результатов целесообразно проводить под небольшим увеличением, используя для этого иногда специальный прибор – *агглютиноскоп* (рис. 22). В качестве контроля используются пробирка с неразведенной сывороткой и пробирка с физиологическим раствором, в первую вносится физиологический раствор, во вторую – диагностикум в объемах, равных объему диагностикума, вносимого в опытные пробирки (пробирки с разведениями испытуемой сыворотки).



Рис.22. Агглютиноскоп

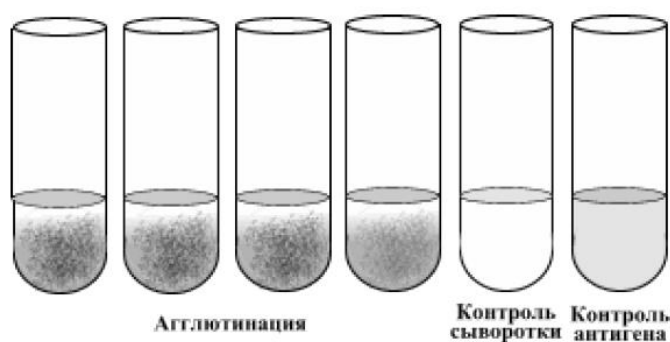


Рис. 23. Развернутая РА в пробирках (по [38]).

Интенсивность агглютинации учитывают по системе “четыре плюса”, при этом полная агглютинация обозначается «4+», частичная агглютинация – «3+» или «2+», сомнительный результат – «1+». В контрольных пробирках агглютинации не должно быть вообще. Положительным результатом считается агглютинация не менее чем на «2+», последнее разведение, в котором наблюдается положительный результат, принимается за титр антител (рис. 23).

#### 2.2.1.1.2. Непрямая РА

Непрямая или пассивная РА – это реакция, при постановке которой используются частицы-носители, покрытые растворимыми антигенами или антителами. В этом варианте РА либо антитело, либо антиген фиксируются на инертном носителе, и когда соответствующий антиген или антитело вступает в реакцию, частицы или клетки агглютинируют, т.е. слипаются. В пассивной агглютинации используются различные инертные носители. Иногда пассивную РА, при которой на носителе фиксируется не антиген, а антитело, именуют *обратной пассивной агглютинацией*.

Наиболее распространенный тип пассивной агглютинации – это *реакция агглютинации латекса (РАЛ)*, при которой в качестве носителей антигенов или антител используются частицы латекса. Если в исследуемом образце присутствует соответствующий антиген или антитело, он будет связываться с антигеном или антителом на частицах латекса, что приведет к образованию видимых перекрестно-сшитых агрегатов или скоплений. В этом варианте РА сорбция молекул антитела или антигена на латексных шариках увеличивает количество антигенсвязывающих участков, т.е. повышает чувствительность теста.

Частицы латекса, используемые в серологических реакциях, имеют размер 0,79-0,81 мкм. Взвесь таких частиц латекса разводится в соотношении 1:10 боратым или глициновым буфером ( $pH\ 8,2$ ). Приготовленную взвесь “нагружают” антигеном или антителами в соотношении 1:10 и выдерживают в течение 2 часов

при температуре 37 °С. Частицы латекса, нагруженные антигеном или антителами, используют в реакции определения неизвестного антигена по известной сыворотке или неизвестных антител по известному антигену. Реакция латекс-агглютинации проявляется в течение 2-3 минут. Она хорошо видна невооруженным глазом особенно на темном фоне или под малым увеличением микроскопа. При положительной реакции наблюдают образование фестончатого осадка – “розетки агглютинации”. При отрицательном результате отмечается образование плотного осадка – “пуговки”. Структура и механизм действия латексных диагностикумов представлены на рис. 24.

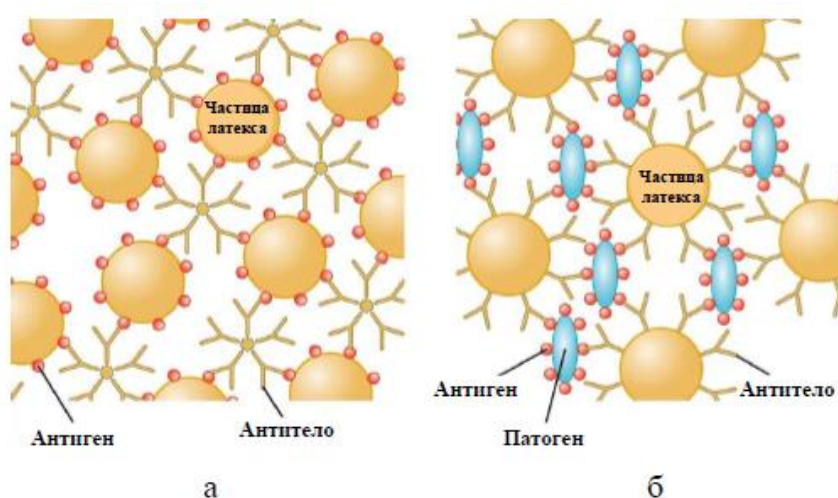


Рис. 24. Структура и механизм действия антигенного (а) и антительного (б) латексных диагностикумов (по [25]).

Регистрацию результатов латекс-агглютинации проводят через 10-15 минут при косом освещении лучше на тёмном фоне. Результат латекс-агглютинации представлен на рис. 25.

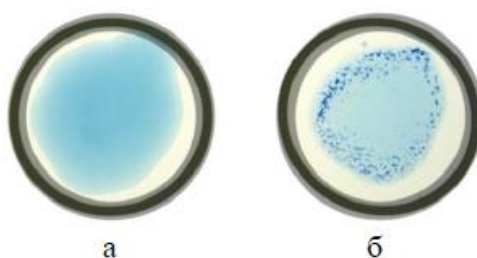


Рис. 25. Отрицательный(а) и положительный результат РАЛ (по [25])

РАЛ имеет ряд преимуществ перед обычной РА:

- Улучшенная визуализация. Размер латексных шариков, используемых в тесте (обычно не менее 0.8 мкм), позволяет легко визуально обнаружить реакцию агглютинации. Это означает, что слипание или агрегацию частиц латекса можно легко наблюдать невооруженным глазом, что облегчает интерпретацию результатов и снижает потребность в специальном оборудовании.

- Простота и скорость. РАЛ известна своей простотой и быстротой. Это простая процедура, которую можно выполнять с минимальной подготовкой, что делает ее доступной для широкого круга медицинских работников. Кроме того, тест дает результаты в короткие сроки, что позволяет быстро ставить диагноз или проводить скрининг пациентов.

- Экономичность и стабильность. Частицы латекса, используемые в тесте, доступны по цене и относительно стабильны. Они не подвержены деградации или износу с течением времени, что обеспечивает стабильное и надежное выполнение теста.

- Специфичность и отсутствие перекрестной реактивности. Частицы латекса не реагируют с другими антителами, что обеспечивает специфичность результатов теста. Это означает, что наблюдаемая РАЛ обусловлена именно взаимодействием между целевым антигеном и соответствующим антителом, что снижает вероятность ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

- Чувствительность. РАЛ продемонстрировала высокую чувствительность при обнаружении целевых веществ. Например, сообщалось, что тест может обнаруживать бактериальные полисахариды на уровне всего 0.1 нг/мл, что делает его пригодным для обнаружения даже следовых количеств антигенов.

Однако существует и ряд ограничений на использование РАЛ:

- Чувствительность к условиям испытаний. Количество связывания, которое происходит в тестах латексной агглютинации, зависит от таких факторов, как рН, осмолярность и ионная концентрация раствора. Если выбранные условия не оптимальны возможны ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

- Помехи от ревматоидного фактора. Ревматоидный фактор представляет собой антитело, нацеленное на Fc-область IgG, и его присутствие в образце может привести к перекрестной реактивности и неправильной интерпретации теста.

Все эти особенности РАЛ необходимо учитывать при выборе метода исследования и его проведении.

В качестве носителей антигена или антитела также нередко используются эритроциты (могут использоваться эритроциты людей, овец или цыплят). В этом случае наблюдают *реакцию гемагглютинации (РГА)*. Ее схема представлена на рис. 26.

Если эритроциты покрыты антигеном и используются для обнаружения в сыворотке антител, реакцию называют *реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА)*.

Если же на эритроцитах фиксированы антитела (соединены с эритроцитами своими Fc-фрагментами) и реакция используется для обнаружения в образцах соответствующих антигенов, она именуется *обратной пассивной гемагглютинацией (ОПГА)*, или *реакцией пассивной гемагглютинации (РПГА)*, или *реакцией обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА)*.

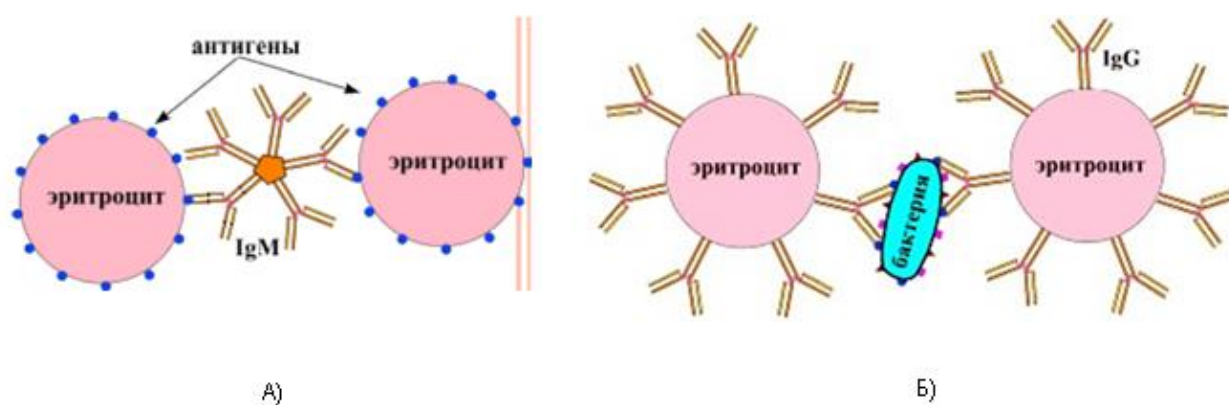


Рис. 26. Схема РГА (по [18, 25, 38])

А) Схема РНГ

Б) Схема ОПГА (РПГА, РОНГА)

Необходимо указать, что известна способность эритроцитов склеиваться без участия специфических антител, в частности при фиксации на них некоторых вирусов (вирусы гриппа, эпидемического паротита, кори). Это явление именуется *прямая* или *вирусная гемагглютинация* (или просто *гемагглютинация*), которая может подавляться специфическими антителами, направленными против вируса, что приводит к явлению, называемому ингибированием гемагглютинации и используется при постановках *реакции торможения гемагглютинации* (РТГА) (рис. 27).

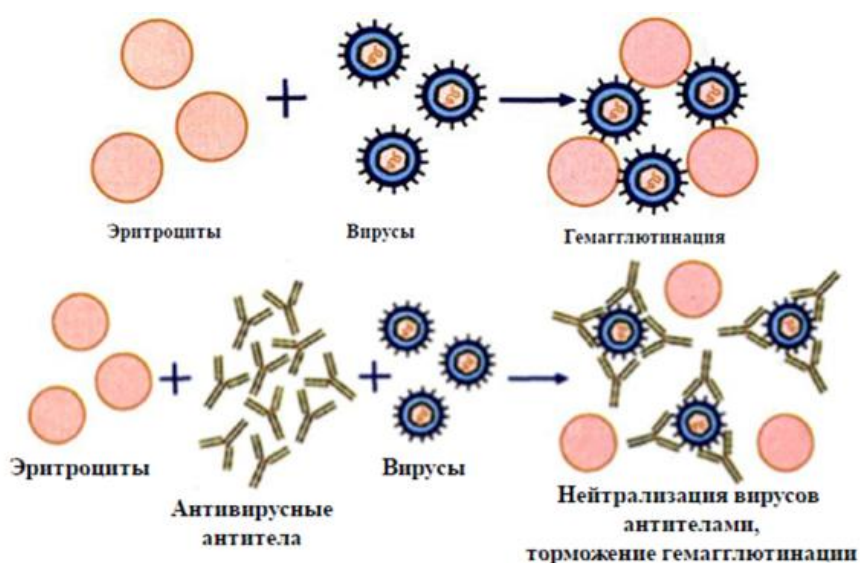


Рис. 27. Схемы реакции вирусной агглютинации и РТГА (по [18])

Некоторыми авторами (см. [25]) к этой же категории, т.е. к *реакции прямой гемагглютинации*, происходящей без участия специфических антител, отнесена реакция определения групп крови в системе *ABO*, что явно не соответствует действительности, тем более, что в том же источнике в числе компонентов этой реакции указаны и стандартные сыворотки, содержащие соответствующие антитела.

Как следует из изложенного, обязательными компонентами постановки РА являются *диагностические агглютинирующие сыворотки* (при идентификации антигена - *сероидентификации*) и *диагностикумы* (при определении антител - *серодиагностике*).

Диагностические агглютинирующие сыворотки содержат известные антитела. Их получают путем многократной иммунизации (*гипериммунизации*) животных-продуцентов соответствующими антигенами.

Для получения сывороток, используемых при идентификации микроорганизмов, в качестве антигенов выступают чаще всего целые микробные клетки, убитые нагреванием или формалином; использование для этой цели очищенных отдельных антигенов бактерий (О, К, Н), разумеется, возможно, но здесь нужно учитывать высокую стоимость таких препаратов. Для получения анитоксической диагностической сыворотки иммунизацию осуществляют соответствующим анатоксином.

После гипериммунизации целыми микробными клетками сыворотка животных содержит антитела ко всем антигенам соответствующих бактерий, поэтому ее называют “нативной” или “неадсорбированной” сывороткой (рис. 28).

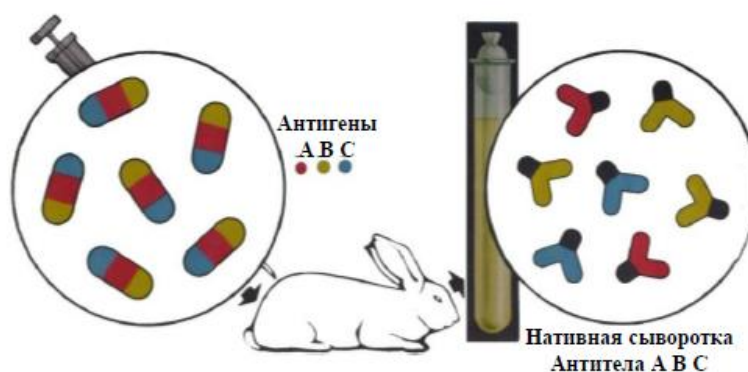


Рис. 28 Получение нативной сыворотки (по [25])

Неадсорбированные агглютинирующие сыворотки обладают высоким титром - до 1:12800 - 1:25600, но они способны агглютинировать все бактерии той же группы (семейства, рода), что, естественно, затрудняет сероидентификацию выделенного микроба.

Для выделения из нативной сыворотки антител к отдельным антигенам используют *метод адсорбции по Кастеллани*. Метод адсорбции по Кастеллани (см.

рис 29) состоит в том, что при добавлении к нативной агглютинирующей сыворотке родственных бактерий происходит адсорбция (связывание) групповых антител на бактериальных клетках, и при последующем удалении бактерий из сыворотки (с помощью центрифугирования, стерилизующей фильтрации) в ней остаются видоспецифические антитела.

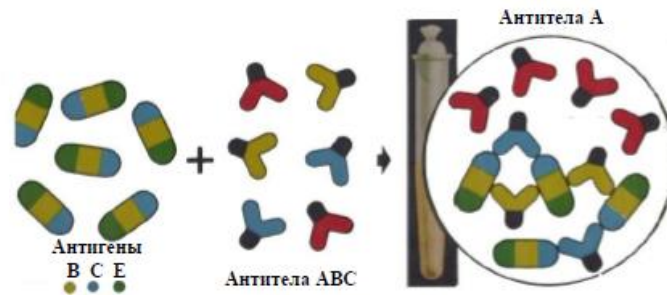


Рис. 29. Метод адсорбции агглютиногенов по Кастеллани (по [25]).

В зависимости от полноты истощения групповых агглютининов можно получить *монорецепторные сыворотки* (сыворотки, имеющие антитела только к одному антигену) или *поливалентные сыворотки* (сыворотки, дающие реакцию агглютинации с двумя-тремя родственными бактериями). В качестве адсорбента могут применяться живые или убитые бактерии. Наилучшей адсорбционной способностью обладает живая культура.

*Антигенные диагностикумы* представляют собой инактивированные нагреванием или воздействием формалина цельные микробные клетки (корпускулярные антигены), или выделенные тем или иным способом и очищенные антигенные субстанции микробов (молекулярные антигены), сорбированные на частицах нейтрального носителя (эритроциты, латекс, целлюлоза и др.).

*Сероидентификация* может быть осуществлена также с помощью реакции *коагглютинации*, основанной на способности белка А золотистого стафилококка неспецифически связывать *Fc*-фрагменты иммуноглобулинов, оставляя свободными их *Fab*-фрагменты. На этом принципе основано изготовление диагностикумов, состоящих из стафилококков с сорбированными на их поверхности известными антителами. При добавлении к такому диагностикуму соответствующих антигенов происходит их связывание с активными центрами антител (*Fab*-



фрагментами). В результате такой коаггутинации образуются хлопья, состоящие из стафилококков с сорбированными на их поверхности антителами диагностической сыворотки и клеток идентифицируемого микроба (рис. 30).

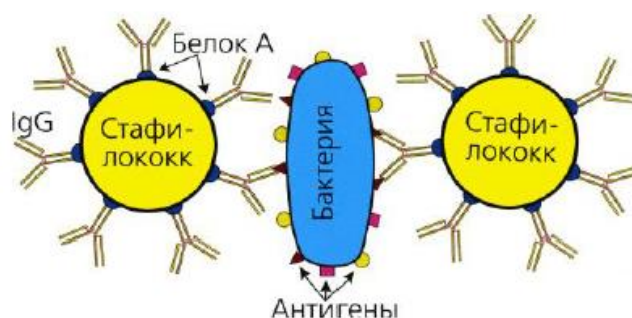


Рис. 30. Схема реакции коаггутинации (по [18])

### 2.2.1.2. Реакция преципитации

Реакции преципитации (РП) (от латинского *praecipito* – осаждать) основаны на феномене образования видимого осадка (*преципитата*) в растворе или в виде полос преципитации в геле после взаимодействия растворимых антигенов (*преципитиногенов*) со специфическими антителами (*преципитинами*). Гелевой основой служат агар, агароза, карбоксиметилцеллюлоза и другие соединения. В качестве реагентов в РП используют гипериммунные преципитирующие сыворотки с высокими титрами антител к гомологичным антигенам.

РП характеризуется чрезвычайно высокой чувствительностью и специфичностью. Она позволяет обнаружить ничтожные следы антигена (до разведения 1:100000 и выше). Действие преципитирующих сывороток на антиген сходно с действием агглютинирующих.

Выделяют следующие наиболее распространенные разновидности реакции преципитации, используемые в КЛД:

- реакция кольцепреципитации;
- реакция флоккуляции.
- реакции преципитации в геле (реакция простой иммунодиффузии, реакция радиальной иммунодиффузии по Манчини и реакция встречной иммунодиффузии по Оухтерлони);

### 2.2.1.2.1. Реакция кольцепреципитации

Известны три варианта постановки реакции:

*метод «наслаивания» антигена,*

*метод «подслаивания» антител,*

*микровариант.*

В первом варианте реакцию проводят в узких преципитационных пробирках (пробирки Уленгута) (см. рис. 31). В пробирку вносят 0,2-0,4 мл преципитирующей сыворотки, осторожно по стенке пробирки в наклонном положении на иммунную сыворотку наслаивают такое же количество растворимого антигена. Разная плотность реагентов не позволяет им смешиваться. После этого пробирку осторожно ставят вертикально в штатив. Результаты реакции учитывают в зависимости от вида антигена и антител через 5–10 мин, 1–2 ч или через 20–24 ч. Учет выполняют визуально, лучше всего – на темном фоне. В случае положительной реакции в пробирке на границе между реагентами появляется преципитат в виде кольца белого цвета. Если в качестве антигенов в реакции кольцепреципитации используют прокипяченные и профильтрованные экстракты тканей, то такая реакция называется *реакцией термпреципитации* или *реакцией Асколи* (реакция, при которой выявляют сибирезвенный антиген).

Во втором варианте в пробирку вначале вносят антиген, а затем осторожно при помощи пастеровской пипетки на дно пробирки, под антиген, «подслаивают» иммунную сыворотку.

Третий вариант разработан для экономии компонентов. В этом случае используют стеклянные капилляры или тонко оттянутые кончики пастеровских пипеток диаметром 0,5-1 мм. Капилляр опускают одним концом во флакон с преципитирующей сывороткой, набирают ее на высоту 1-1,5 см, закрывают пальцем верхнее отверстие капилляра, ватой удаляют с капилляра излишек сыворотки и погрузив капилляр в раствор антигена, набирают равный объем антигена. Капилляр закрепляют вертикально в пластилине. Результаты учитывают, как и при обычной реакции кольцепреципитации

Обязательное условие постановки реакции кольцепреципитации — прозрачность раствора реагентов, поэтому при необходимости сыворотку и раствор антигена фильтруют, например, через асбестовую вату.

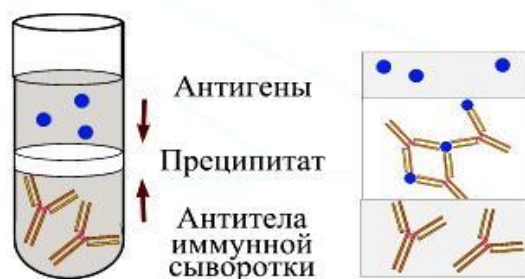


Рис. 31. Реакция кольцепреципитации (по [13]).

#### 2.2.1.2.2. Реакция флоккуляции

При исследовании взаимодействия в жидкой среде токсинов (анатоксинов) и антитоксинов возможно проявление РП в виде *флоккуляции* – возникновение опалесценции или хлопьевидной массы (см. рис. 32). Эта реакция возможна только с лошадиными антитоксическими сыворотками или человеческими анти-тиреоглобулиновыми сыворотками при избытке антигена. Она обычно применяется для определения активности антитоксинов.

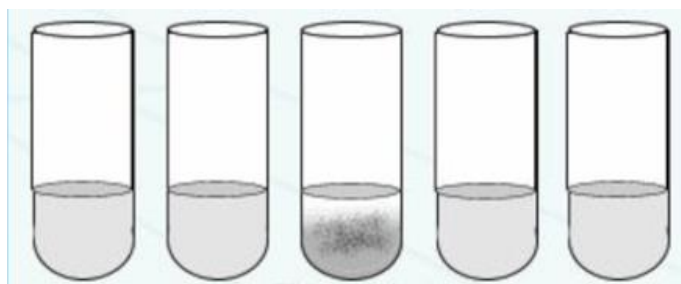


Рис. 32. Реакция флоккуляции по Рамону (по [46]).

#### 2.2.1.2.3. Реакции преципитации в геле

РП в геле основаны на том, что антигены и антитела, диффундируя и встречаясь в геле, образуют видимые невооруженным глазом белые линии преципитата. Для постановки обычно используют 1,5-2,0% агаровый или агарозный гель.

Можно выделить два основных варианта постановки:

- *реакция встречной иммунодиффузии;*
- *реакция радиальной иммунодиффузии.*

*Реакция встречной иммунодиффузии (реакция диффузной преципитации, реакция двойной диффузии по Оухтерлони)*

Это РП, которая основана на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимых антигенов в агаровом геле (двойная диффузия).

На хорошо обезжиренное стекло, лежащее строго горизонтально, наливают расплавленный агар в количестве, достаточном для формирования слоя геля толщиной 3-4 мм. В нем штампами вырезают лунки. При идентификации антигенов одна из этих лунок (обычно это центральная лунка, остальные располагаются на одинаковых расстояниях от нее) предназначена для иммунной сыворотки с известным составом антител в ней, а остальные – для идентифицируемых антигенов. При оценке наличия антител в исследуемых образцах такая лунка предназначается для раствора известного антигена, а остальные – для исследуемых образцов сыворотки.

Агар из лунок удаляют, на дно каждой вносят каплю горячего агара с последующим его удалением, что создает «дно» лунок и предотвращает подтекание компонентов под гель. В лунки вносят соответствующие их назначению реагенты, следя за тем, чтобы реагенты не выходили за края лунок. Затем стекло помещают в эксикатор, на дно которого должно быть налито небольшое количество воды с антисептиком; эксикатор выдерживают заданное время при комнатной температуре и регистрируют результат – полосы преципитации в агаре там, где произошла реакция «антиген-антитело».

В зависимости от конкретной задачи применяют штампы с различным количеством и диаметрами пробойников, обеспечивающие получение лунок заданного диаметра и на заданных расстояниях. При изучении неизвестных реагентов оптимальное расстояние между лунками устанавливают в предварительных опытах.

При идентификации различных антигенов возможны три варианта результата РП (рис. 33):

1. у сравниваемых антигенов гомологичные детерминанты, антигены оцениваются как идентичные;
2. у сравниваемых антигенов нет гомологичных детерминант, антигены оцениваются как неидентичные;
3. у сравниваемых антигенов часть детерминант гомологична, часть негомологична, антигены оцениваются как частично идентичные



Рис. 33. Схемы вариантов реакции диффузной преципитации (по [50])

Варианты 1, 2:  $Ag-1$ ,  $Ag-2$  – сравниваемые антигены,  $Am$  – антитела к сравниваемым антигенам,  $ЛП$  – линия преципитации.

Вариант 3:  $Ag-a$ ,  $Ag-b$  – сравниваемые антигены, «а» – специфическая детерминанта, «в» – гомологичная (общая) детерминанта;  $Am-a, b$  – антитела к антигенам  $Ag-a$  и  $Ag-b$ ;  $ЛП-в$  – линия преципитации гомологичных антигенов «в»,  $ЛП-а$  – линия преципитации антигена «а» – «шпора»

На рис. 34. представлен реальный вид результатов такой постановки РП.

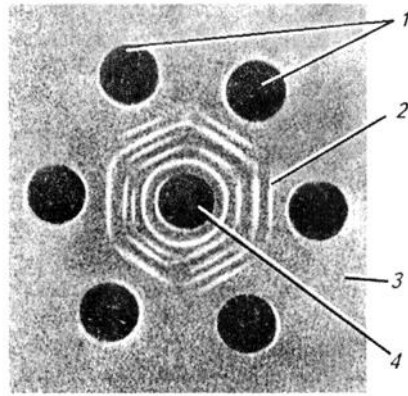


Рис. 34. Реакция диффузной преципитации в геле (по [50])

1 – лунки со сравниваемыми антигенами, 2 – полосы преципитации, 3 – стеклянная пластинка с агаровым гелем, 4. Лунка с иммунной сывороткой.

С помощью реакции диффузионной преципитации можно обнаруживать антитела в сыворотке крови и определять их титр. Для этого в центральную лунку вносят известный растворимый антиген, а в остальные — исследуемые сыворотки (в одном разведении – при оценке наличия или в ряде последовательных разведений – при оценке титра) (рис. 35).

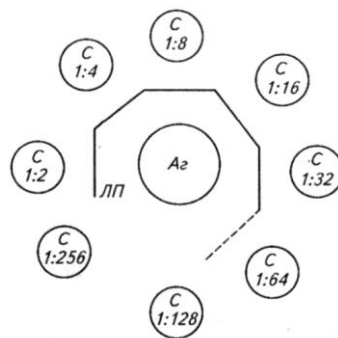


Рис. 35. Определение титра антител с помощью реакции диффузной преципитации (по [50])

$C1:2- C1:256$  – разведения исследуемой сыворотки;  $A_2$  – известный антиген;  $ЛП$  – линия преципитации. Титр сыворотки в данном случае 1:64.

Чтобы полосы преципитации стали более четкими, пластины обрабатывают солями кадмия, для чего пластины отмывают в физиологическом растворе и заливают 0,65% раствором сульфата кадмия – через несколько минут полосы преципитации становятся в несколько раз более четкими.

При оценке способности выделенных бактерий продуцировать экзотоксины РП может быть проведена посевом тестируемых культур изолированными колониями (бляшками) вдоль предварительно нанесенной на поверхность агара полоски фильтровальной бумаги, смоченной соответствующей антитоксической сывороткой. После экспозиции в инкубаторе между колониями культур, продуцирующих экзотоксин, и полоской бумаги образуются линии преципитации (рис. 36).

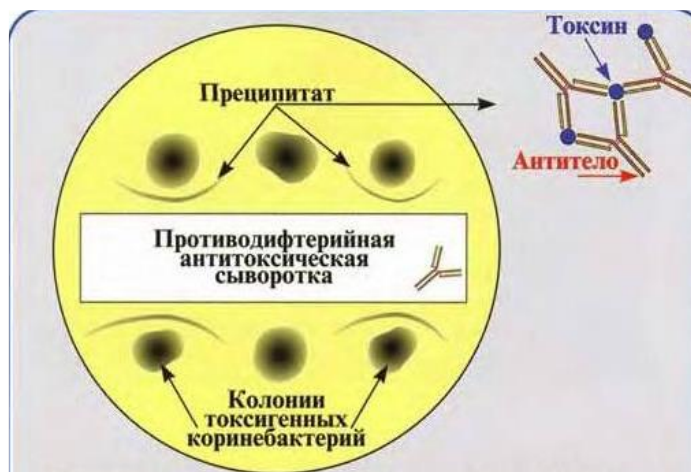


Рис. 36. Определение токсигенности *Corynebacterium diphtheriae* с использованием реакции диффузной преципитации (по [38])

Крайние колонии – токсигенные штаммы; в центре – колонии нетоксигенного штамма

#### *Реакция радиальной иммунодиффузии (по Манчини)*

Для постановки реакции в расплавленный агаровый гель добавляют иммунную сыворотку, гель равномерно наносят на стекло и после застывания делают в геле лунки, в которые вносят последовательные разведения антигена. Антиген, диффундируя в гель, образует с антителами кольцевые зоны преципитации вокруг лунок. Диаметры колец преципитации пропорциональны концентрации антигена (рис. 37).

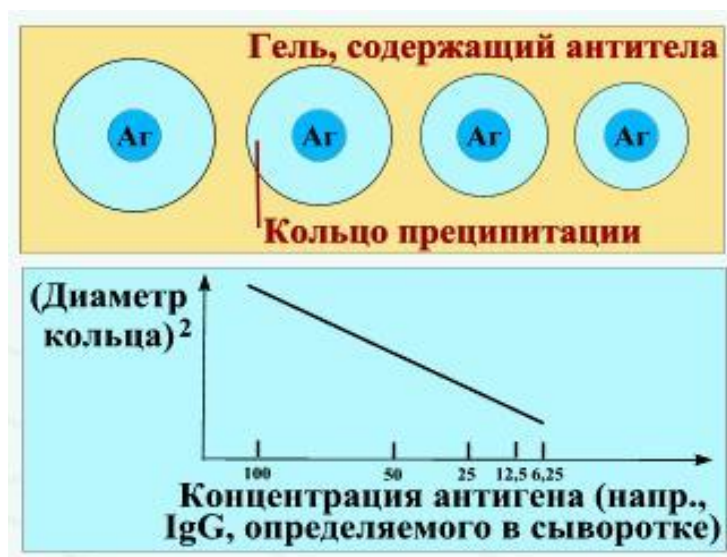


Рис. 37. Реакция радиальной иммунодиффузии (по Манчини) (по [13]).

При постановке РП необходимо учитывать возможность ложноотрицательных реакций при неэквивалентном содержании реагентов в реакционной среде, т.е. при избытке одного из них (соответственно, недостатке другого). При избытке антигена наблюдается феномен *постзоны*, при избытке антитела – феномен *прозоны*, т.е. состояния, при которых не образуются соответствующие решетчатые сети антиген-антитело, обуславливающие конечный видимый эффект их взаимодействия.

### 2.2.1.3. Реакция нейтрализации

Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микроорганизмов или их токсинов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой микробных антигенов антителами. Эта их способность используется при постановке *реакции нейтрализации*, которая ставится либо *in vivo* (обычно на мышах или куриных эмбрионах), либо *in vitro* на культуре ткани. При отсутствии у животных или в культуре ткани повреждающего действия микроорганизмов или их антигенов, токсинов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о специфичности взаимодействия комплекса антиген-антитело (рис. 38).



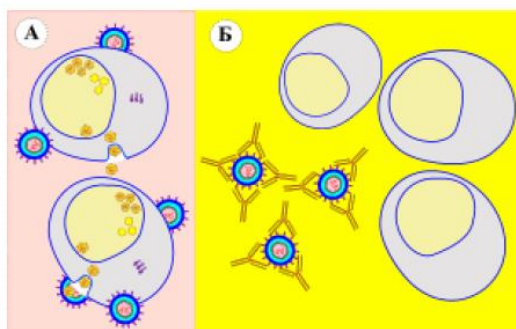


Рис. 38. Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток (по [38])  
 А - цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов  
 Б - ЦПЭ отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами.

#### 2.2.1.4. Реакции иммунного лизиса

Реакция иммунного лизиса - растворение жизнеспособных клеток (корпускулярных антигенов), соединенных со специфическими антителами, в присутствии комплемента.

Реакции иммунного лизиса протекают при обязательном участии комплемента (дополнительный фактор). Краткая характеристика этого фактора дана в главе 1.3. «Гуморальные элементы ИС».

##### 2.2.1.4.1. Реакция иммунного гемолиза

К реакциям иммунного лизиса можно отнести *реакцию иммунного гемолиза* (лизис эритроцитов в присутствии специфических антител-гемолизин и комплемента) и *реакцию иммунного бактериолиза* (лизис бактериальных клеток в присутствии специфических антител-бактериолизин и комплемента). Последняя в практике КЛД применяется редко, зато *реакция иммунного гемолиза* – это элемент хорошо известного диагностического теста – *реакции связывания комплемента (РСК)*, до недавнего времени бывшего одним из основных лабораторных тестов на сифилис – *реакции Вассермана*.

РСК заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют иммунный комплекс, к которому присоединяется комплемент (С), т.е. происходит связывание комплемента комплексом антиген-антитело. Если же комплекс антиген-антитело не образуется, то комплемент остается свободным (см. рис. 39 и 40).



Рис. 39. Реакция связывания комплемента с сывороткой крови больного животного (положительная реакция) (по [13]).

РСК относится к сложным многокомпонентным серологическим реакциям, для ее реализации нужны две самостоятельные системы – диагностическая и индикаторная. Диагностическая система включает антиген (диагностикум), исследуемую сыворотку крови пациента, содержащую искомые антитела и комплемент. Индикаторная система – это суспензия эритроцитов барана, сенсibilизированная антителами к ним же.

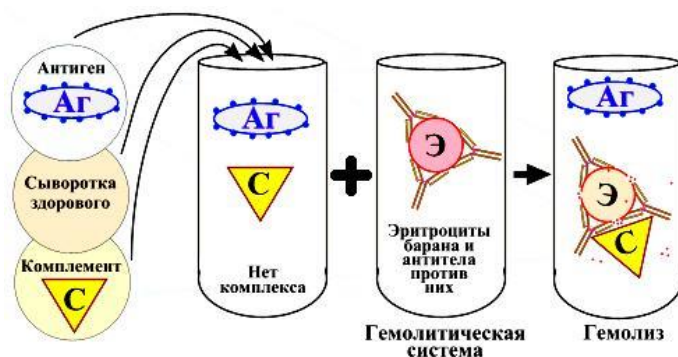


Рис. 40. Реакция связывания комплемента с сывороткой крови здорового животного (отрицательная реакция) (по [13]).

Реакция выполняется в два этапа. На первом (специфическая фаза реакции) смешиваются в определенных пропорциях и инкубируются все три компонента диагностической системы. При наличии в исследуемой сыворотке искомым антител они связываются с антигеном диагностикума, и образованный комплекс «антиген-антитело» через Fc-фрагмент антител связывается с компонентом, образуя комплекс «антиген–антитело–комплемент». При отсутствии антител комплемент остается свободным, и иммунные комплексы «антиген–антитело–комплемент» не образуются. Внешне образование иммунных комплексов не проявляется никакими феноменами, и для индикации их наличия (т.е. для регистрации результатов РСК) после инкубации в диагностическую систему добавляют индикаторную систему (индикаторная фаза реакции). Объединение двух систем и инкубация их при определенном режиме с последующим центрифугированием позволяет зарегистрировать результаты РСК по феномену задержки гемолиза. Если на первом этапе реакции комплекс «антиген-антитело» связывает комплемент, на втором этапе не произойдет гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов (реакция положительная). Если в исследуемом образце нет искомого антитела, комплемент остается свободным и на втором этапе он присоединяется к комплексу «эритроцит–гемолизин», вызывая гемолиз (реакция отрицательная) (рис. 41).



Четко положительный  
результат РСК  
(прозрачная надосадочная  
жидкость, четкий зонтик  
из эритроцитов)



Четко отрицательный  
результат РСК (полный  
гемолиз эритроцитов  
(лаковая кровь), зонтик  
отсутствует)

Рис. 41 Положительный и отрицательный результат РСК (по [13]).

Регистрация результатов РСК проводится по системе «4+»:

«-» – РСК сопровождается полным гемолизом, как описано выше;

«4+» РСК соответствует стопроцентному связыванию антигена антителами и образованию комплексов «антиген–антитело–комплемент», после центрифугирования в пробирке образуется осадок эритроцитов, супернатант прозрачный, бесцветный;

«3+» – РСК соответствует семидесятипятипроцентному связыванию антигена антителами, а значит определенная часть комплемента остается в свободном виде и активируется гемолитической системой, после центрифугирования на дне пробирки виден осадок эритроцитов, супернатант имеет слегка желтоватую окраску из-за лизиса части эритроцитов;

«2+» – РСК соответствует пятидесятипроцентному связыванию антигена антителами, а значит практически половина комплемента находится в свободном виде и вызывает гемолиз практически половины эритроцитов индикаторной системы, после центрифугирования в пробирке на дне виден осадок эритроцитов менее значительный, чем при 3+ и 4+ РСК, а супернатант окрашен в красно-оранжевый цвет;

«+» –сомнительный результат РСК, после центрифугирования на дне имеется незначительный осадок эритроцитов, а супернатант окрашен, как и при отрицательной РСК.

#### *Компоненты РСК:*

В РСК используются следующие компоненты:

- испытуемая сыворотка, инактивированная прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 минут;
- антиген (взвесь убитых микробов, лизат микробов, полные антигены, гаптены, экстракты тканевых липидов);
- комплемент (свежая или высушенная сыворотка крови морских свинок; перед постановкой РСК проводят титрование комплемента в реакции гемолиза и определение рабочей дозы);
- гемолитическая сыворотка (прогретая при температуре 56°С сыворотка крови кроликов, иммунизированных 50% взвесью эритроцитов барана), используется только как составная часть гемолитической системы при постановке реакции связывания комплемента;
- 3% взвесь эритроцитов барана;
- физиологический раствор;
- контрольная сыворотка.

#### *2.2.1.4.2. Реакция иммунного бактериолиза*

Реакция иммунного бактериолиза – это растворение бактерий в присутствии специфических антител – бактериолизинов и комплемента. Она может происходить как *in vivo*, так и *in vitro*. Ингредиентами реакции являются живые бактерии, специфические по отношению к ним антитела, комплемент. В КЛД используется редко, поскольку многие виды бактерий не способны к такому лизису.

## 2.2.2. Иммунодиагностические реакции с использованием меченых реагентов

В эту группу входит ряд иммунологических реакций, в которых один из реагентов несет на себе «метку», т.е. вещество, которое может быть обнаружено физическими или химическими методами (радиоизотоп, флуорохром, фермент). Соответствующие методы исследования именуется радиоиммунными, иммунофлуоресцентными и иммуноферментными.

### 2.2.2.1. Радиоиммунный анализ

*Радиоиммунный анализ (РИА)* – это наиболее ранний метод анализа с использованием меченых реагентов, предложенный еще в конце 50-х годов прошлого века. В нем в качестве метки одного из реагентов иммунологической реакции используются радиоактивные изотопы, чаще всего изотопы йода и трития. Чувствительность РИА очень высока, некоторые методики позволяют выявлять аналиты в концентрациях до  $10^{-14}$  моль/л.

В зависимости от техники постановки выделяют два основных способа РИА - *жидкофазный* (классический) и *твердофазный*.

*Жидкофазный конкурентный РИА* основан на феномене конкуренции определяемого антигена с известным количеством меченых антигенов за ограниченное количество антител к аналиту, введенных в систему. Чем больше в исследуемой жидкости содержится аналита, тем меньше меченых антигенов свяжется с антителами и, следовательно, больше останется в растворе.

В *твердофазном РИА* один из иммунореагентов иммобилизируется на твердом носителе, в качестве которого применяются полистироловые шарики.

При всех достоинствах РИА его использование в практике КЛД осложняется ограниченным сроком жизни радиоактивной метки, что вызывает необходимость постоянной замены реактивов, относительно дорогим специальным оборудованием для регистрации радиоактивности, необходимостью специальных

мер радиационной защиты и соответствующей квалификации обслуживающего персонала.

#### 2.2.2.2. Иммунофлуоресцентный анализ

Перечисленных недостатков РИА лишен *иммунофлуоресцентный анализ (ИФЛА)*, или *метод Кунса*, или *реакция иммунофлуоресценции (РИФ)*, или *метод флуоресцирующих антител (МФА)*, основанный на том, что антигены тканей или микробы после обработки иммунными сыворотками, содержащими антитела, меченые флуорохромами, способны светиться в ультрафиолетовых лучах. В качестве флуорохромов могут быть использованы флуоресцеин изотиоцианат, диметиламин-нафталин-сульфанил-хлорид, аурамин, корифосфин, порфирины, берберин.

Регистрация результатов реакции осуществляется с помощью люминесцентного микроскопа, в оптическую систему которого устанавливается набор светофильтров, обеспечивающих освещение препарата ультрафиолетовым или сине-фиолетовым светом с заданной длиной волны. Это заставляет флуорохром светиться в заданном диапазоне спектра. Оценка результатов может быть основана как на чисто качественном описании – характере свечения, форме, размерах светящихся объектов и их взаимном расположении, так и на количественных оценках интенсивности свечения меченых ИК с помощью специальной аппаратуры.

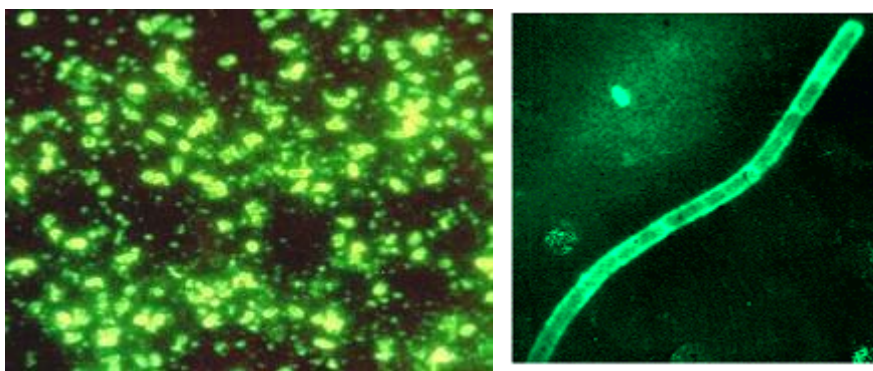


Рис. 42. Свечение комплекса «антиген-антитело, меченое люминофором» при люминесцентной микроскопии (по [13]).

Следует отметить, что нередко в литературе этот метод анализа именуют «люминесцентным», но, хотя флуоресценция – это частный случай люминесценции, т.е. свечения вещества (люминофора), облученного УФЛ, и, формально, такое наименование метода вполне законно, на практике все же следует учитывать, что флуорохромы (флуорофоры), т.е. частный случай люминофоров, светятся только в момент облучения, тогда как к люминофорам относятся также те вещества, которые могут светиться и после облучения УФЛ. Для практического использования в иммунодиагностических исследованиях, т.е. для детекции интенсивности свечения иммунного комплекса, в котором есть меченый реагент, возможно, пригодны и те, и другие, поскольку этот параметр оценивается именно в момент облучения.

Достоинства ИФЛА – высокая специфичность и чувствительность, простота постановки, минимальное количество компонентов. Это экспресс-метод диагностики, так как ответ можно получить максимум в течение нескольких часов.

К недостаткам относится субъективизм в оценке интенсивности свечения *ad oculus*, но этот недостаток в настоящее время легко устраняется использованием средств аппаратного учета интенсивности свечения.

Различают две основные разновидности ИФЛА – *прямой* и *непрямой*.

Типовые схемы постановки прямой и непрямой РИФ представлены на рис.

43.



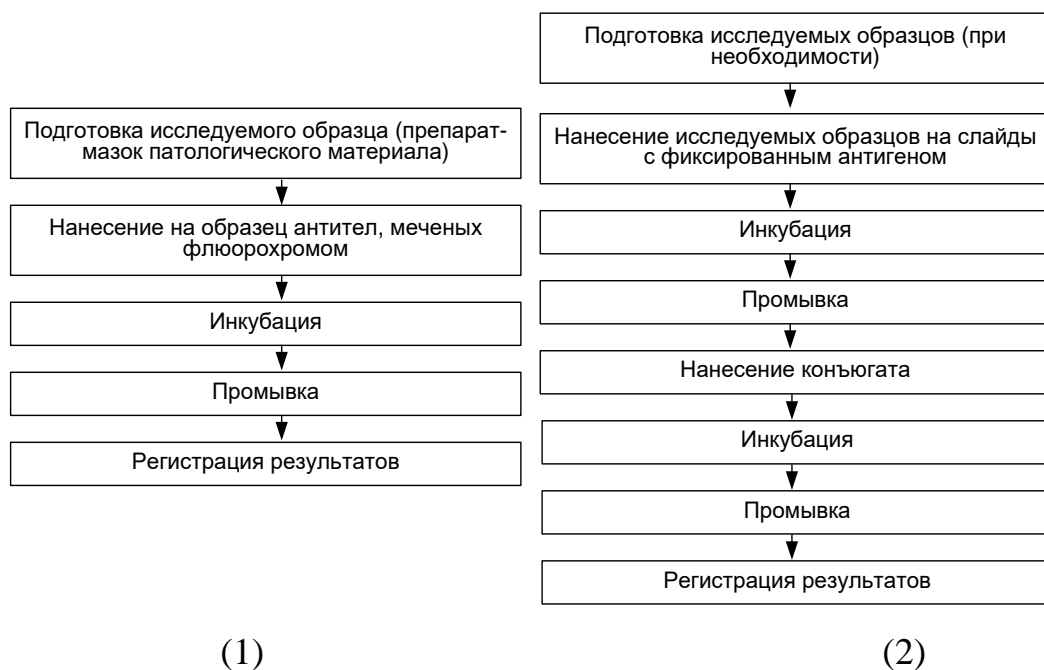


Рис. 43. Типовые схемы постановки прямой (1) и непрямой (2) РИФ

#### 2.2.2.2.1. Прямой иммунофлуоресцентный анализ

Прямой ИФЛА (прямая реакция иммунофлуоресценции, РИФ) – антиген связывается с антителом, конъюгированным с флуоресцентной меткой (рис. 43).

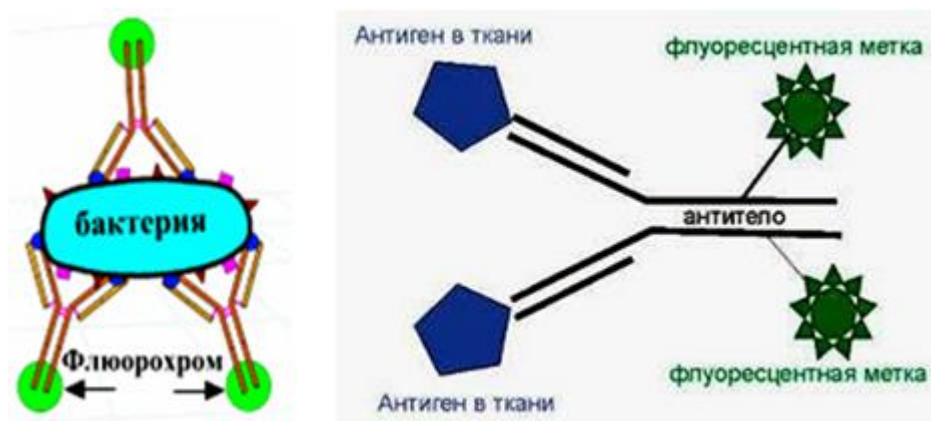


Рис. 43. Схема прямой РИФ (по [13]).

Компоненты прямого ИФЛА:

- исследуемый материал – культуры бактерий, грибов, простейших; срезы тканей, препараты из материалов от больных людей (кал при холере, мокрота при коклюше); инфицированные культуры клеток (аналит – антиген);

- конъюгат – специфическая иммунная сыворотка, содержащая меченые флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) антитела к искомому антигену;
- изотонический раствор хлорида натрия.

Чаще всего прямой ИФЛА применяют для идентификации возбудителя в исследуемом материале. Из исследуемого материала готовят мазок на предметном стекле, как для обычной микроскопии. Препарат фиксируют спиртом, ацетоном или другим химическим фиксатором, иногда входящим в состав диагностического набора. На поверхность фиксированного мазка наносят конъюгат и инкубируют определенное время. Далее препарат отмывают от несвязанного конъюгата, подсушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее иммерсионное масло и исследуют под люминесцентным микроскопом. На том участке, где локализируются комплексы «антиген-антитело», обнаруживают флуоресценцию — свечение. Бактерии в мазке, обработанные такой специфической сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.

Недостатком этого метода является необходимость иметь в наличии сыворотки для каждого вида идентифицируемого микроорганизма.

#### *2.2.2.2. Непрямой иммунофлуоресцентный анализ*

*Непрямой ИФЛА (непрямая РИФ)* – антиген связывается с неконъюгированным специфическим антителом (первичным антителом). В качестве конъюгата используется антитело, специфичное к первичному (вторичное антитело). Образуется комплекс «антиген-антитело-антитело» (рис. 44).

Непрямой ИФЛА более универсален по сравнению с прямым методом – с его помощью можно выявлять не только антигены, но и антитела.

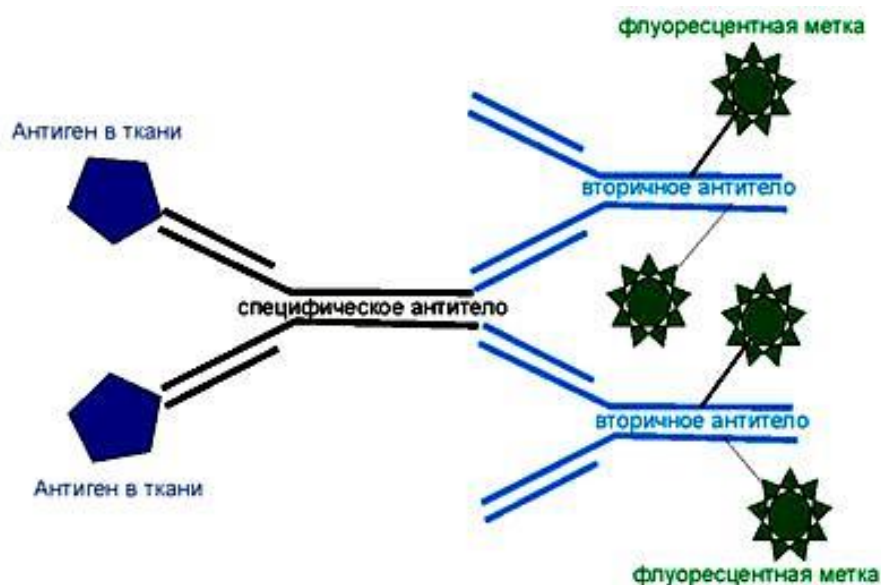


Рис. 44. Схема непрямой РИФ при выявлении в образце антигена (по [13]).

Компоненты непрямого ИФЛА для выявления антигена:

- исследуемый материал – культуры бактерий, грибов, простейших; срезы тканей, препараты из материалов от больных людей (кал при холере, мокрота при коклюше); инфицированные культуры клеток; (аналит – антиген);
  - специфическая к аналиту диагностическая антисыворотка;
  - конъюгат – антиглобулиновая сыворотка, меченная флуорохромом;
  - буферный раствор – изотонический раствор хлорида натрия.

Как и в прямом ИФЛА, готовят мазки из исследуемого материала, их обрабатывают немеченой специфичной диагностической сывороткой; при наличии в образце аналита образуется комплекс «антиген-антитело». На втором этапе на препарат наносят конъюгат. Меченые вторичные антитела взаимодействуют с *Fc*-фрагментом первичных антител, которые являются антигенами для вторичных антител и образуется комплекс «микроб-антимикробные кроличьи антитела-антикроличьи антитела, меченные флуорохромом», который можно обнаружить при люминесцентной микроскопии.

Компоненты ИФЛА для выявления антител:

- исследуемый материал – сыворотка крови пациента (аналит – антитело);
- культура эталонного штамма возбудителя;

- конъюгат – антиглобулиновая сыворотка, меченная флуорохромом;
- буферный раствор – изотонический раствор хлорида натрия.

В этом случае готовят мазки из культуры эталонного штамма возбудителя. На мазок наносят исследуемую сыворотку. При наличии в ней искомых антител они связываются с антигенами микробных клеток; препарат промывают буферным раствором, обрабатывают конъюгатом и оценивают результаты реакции с помощью люминесцентного микроскопа. В случае положительного результата реакции при микроскопии мазка в люминесцентном микроскопе наблюдается специфическое свечение комплекса «антиген-антитело-антитело».

В этом варианте ИФЛА при помощи одной люминесцирующей антивидовой сыворотки можно выявлять микроорганизмы разных видов, и непрямой ИФЛА намного чувствительнее прямого, поскольку с каждой молекулой первичных антител связываются несколько молекул меченых вторичных антител. Кроме того, усилить сигнал, т.е. повысить чувствительность метода можно, используя в качестве вторичных антител не целые их молекулы, *Fab*-фрагменты, конъюгированные с флуоресцентной меткой (рис. 45). Эффект усиления достигается за счет того, что размер *Fab*-фрагментов много меньше размера полных антител, и они легче проникают к месту связывания.

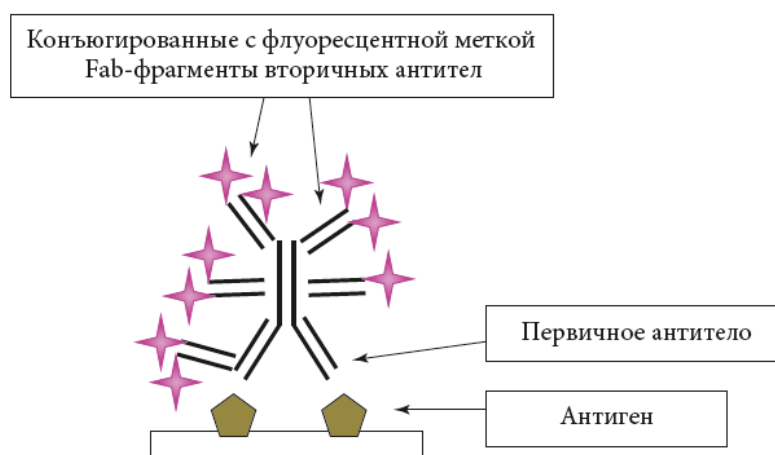


Рис. 45. Схема непрямого метода ИФЛА с использованием конъюгированных *Fab*-фрагментов вторичных антител (по [26]).

Разновидностью непрямого ИФЛА является ИФЛА с комплементом. Заключается этот метод в том, что на фиксированный препарат наносят инактивированную нефлуоресцирующую специфическую сыворотку и комплемент, выдерживают и промывают. Для выявления комплекса «антиген-антитело-комплемент» на препарат наносят флуоресцирующую антикомплементарную сыворотку. При положительной реакции образуется комплекс «антиген-антитело-комплемент-меченые антитела». После промывки и подсушивания препарат исследуют под люминесцентным микроскопом с использованием иммерсионной системы – специального нефлуоресцирующего масла.

### **2.2.2.3. Иммуноферментный анализ**

*Иммуноферментный анализ* (ИФА, *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) – метод иммунохимического анализа, при котором один из специфических реагентов (антиген или антитело) помечен ферментом, т.е. представляет собой *конъюгат*, а результат реакции «антиген-антитело» при наличии в образце искомого анализата проявляется изменением цвета реакционной среды за счет ферментирования меткой *хромогенного субстрата* (вещества, меняющего цвет под влиянием фермента), добавляемого в эту среду, при чем интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству иммунного комплекса в среде. Результаты ИФА могут регистрироваться фотометрически, флуориметрически, биолюминесцентным и хемилюминесцентным методами, чаще всего для этого используется спектрофотометрия.

ИФА может проводиться с качественным учетом результатов, т.е. оценкой наличия анализата по принципу «да»-«нет», но он же может давать и количественную оценку содержания анализата в образце, для чего используется зависимость интенсивности окраски реакционной среды от содержания меченых иммунных комплексов. Эту зависимость определяют при постановке ИФА с использованием калибровочного графика, который строится по результатам исследования входящих в набор калибраторов – реагентов с известным содержанием анализата.

Использование ферментов в качестве метки в иммуноанализе обусловлено, прежде всего, их высокой каталитической активностью, позволяющей с применением соответствующих субстратов обнаруживать аналиты в растворе на уровне  $10^{-15}$  М и ниже.

Простейшей схемой ИФА можно считать его постановку, при которой помечен ферментом один из компонентов специфического иммунного комплекса, комплементарный аналиту (если аналит – антиген, таким реагентом должны быть комплементарные ему антитела; если аналит – антитела, меченым реагентом должен быть соответствующий антиген); это так называемый *однофазный ИФА* (см. рис. 46 А)

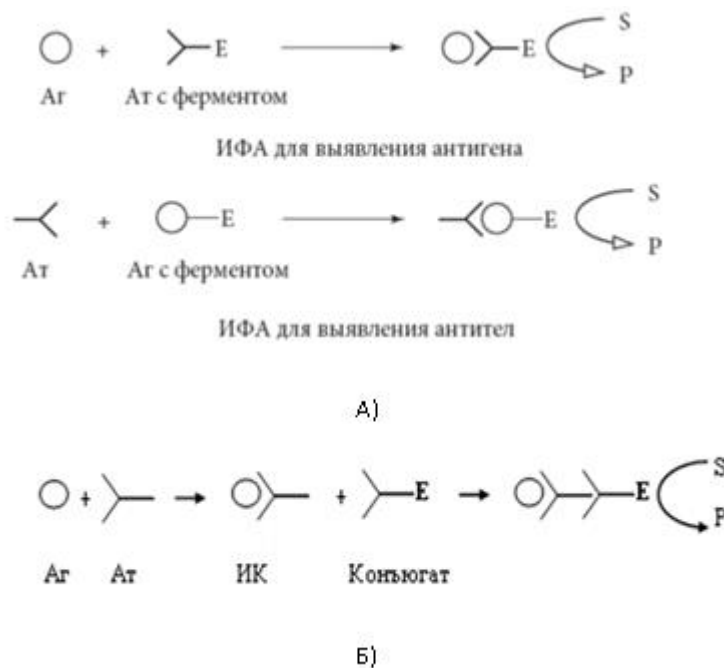


Рис. 46. Схемы однофазного (А) и двухфазного (Б) ИФА (по [26]).  
 Ат – антитело; Аг – антиген, ИК – иммунный комплекс, Е – фермент;  
 S — субстрат; Р — продукт реакции

Поскольку получение конъюгатов для реализации такой схемы технологически достаточно сложно, более употребительной является схема постановки ИФА, при которой метится не один из компонентов специфического ИК с аналитом, а антитела к антигену, входящему в ИК (это обычно антитела к человеческому глобулину), т.е. схема *двухфазного ИФА* (рис. 47 Б)

Если ориентироваться на классификацию методов (вариантов) ИФА, предложенную Н.Е. Максимовой с соавт. [41] и представленную на рис. 47, то все его варианты делятся, прежде всего на те, в которых результат постановки отражает наличие и/или содержание в исследуемом образце иммунного комплекса с искомым анализом (Тип I), и на те, в которых результат отражает наличие и/или содержание оставшихся свободными центров специфического связывания (паратопов) антител (Тип II). Кроме того, все варианты делятся на *конкурентные* и *неконкурентные*, *гомогенные*, *гетерогенные* и *гетеро-гомогенные*.

*Конкурентный ИФА* – это вариант ИФА, при котором на первой стадии одновременно присутствуют аналит и его аналог, меченный ферментом, или аналог аналита, иммобилизованный на твёрдой фазе, конкурирующие за имеющиеся в относительном недостатке центры специфического связывания. При этом необходимым условием является недостаток центров специфического связывания относительно суммарной концентрации аналита и его аналога, иначе определяемая концентрация метки в реакционной среде не будет зависеть от концентрации в ней аналита.

Как следует из приведенной классификационной схемы, *конкурентным* может быть только ИФА II типа, тогда как *неконкурентным* может быть ИФА обоих типов. При этом в постановках *неконкурентного ИФА I типа* необходимо иметь значительное превышение концентрации центров связывания над концентрацией аналита. В *неконкурентном ИФА II типа* оценивается разность общего числа паратопов в реакционной среде и числа паратопов, связанных в иммунные комплексы (т.е. числом образовавшихся иммунных комплексов). В этом случае содержание аналита в реакционной среде должно быть сравнимо с содержанием паратопов, иначе точность определения будет невысокой.

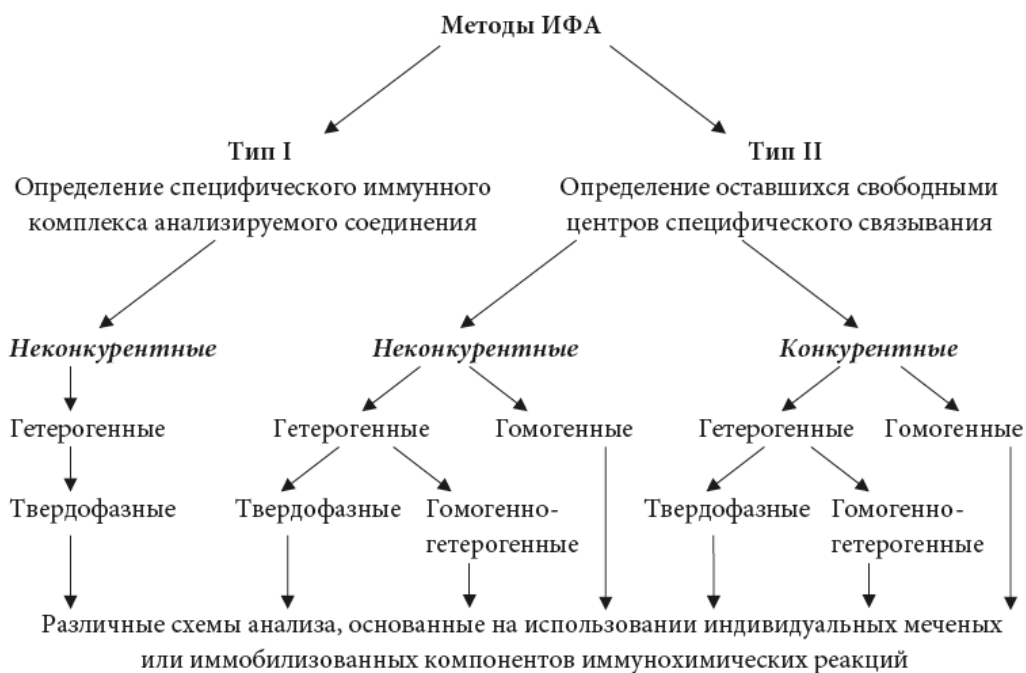


Рис. 47. Классификация вариантов ИФА (по [26]).

По условиям, в которых проводится ИФА, все его варианты можно разделить на *гомогенные* и *гетерогенные*. Последние, в свою очередь, могут быть подразделены на *твердофазные* и *гомогенно-гетерогенные*.

*Гомогенные варианты ИФА* отличаются тем, что все иммунохимические и ферментативные реакции происходят в однофазной системе (в растворе) и не связаны с необходимостью механического разделения и удаления промежуточных продуктов и непрореагировавших компонентов. При этом определение содержания аналита основано на эффекте изменения каталитической активности фермента-метки при образовании ИК. По этой причине его называют еще ЕМІТ-анализ (от англ. *enzyme multiplied immunoassay technique*), или *иммуноаналитический метод с регуляцией ферментативной активности* (рис. 48).



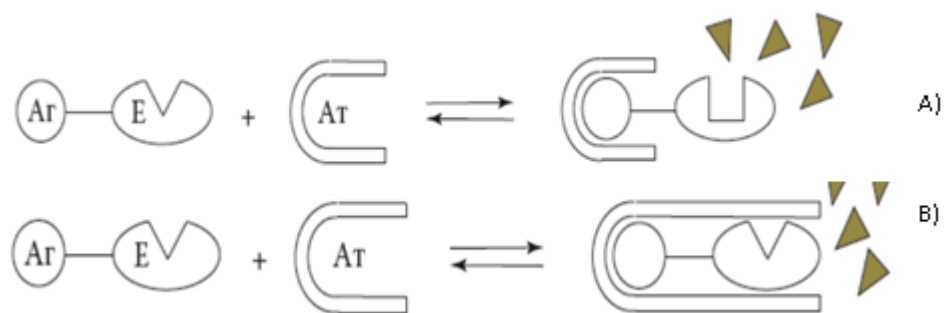


Рис. 48. Варианты потери активности молекулы фермента (по [26]).

Фермент может утрачивать каталитическую активность в конъюгате с антигеном и восстанавливать ее в результате реакции «антиген-антитело» (блок А на рис. 48). При добавлении в систему свободного антигена он, конкурируя за антитела, количество которых ограничено, вызовет регенерацию конъюгата и появление ферментативной активности. И чем больше в анализируемом образце антигена, тем больше его свяжется с антителами и тем больше конъюгата останется в растворе несвязанным и проявит ферментативную активность по отношению к субстрату, изменяя цвет раствора. То есть ферментативная активность конъюгата при этом прямо пропорциональна количеству свободного антигена в исследуемой пробе. И если построить калибровочную кривую, отражающую зависимость между концентрацией антигена и ферментативной активностью конъюгата, можно определить концентрацию антигена в исследуемом образце.

Может быть также использована схема, когда фермент не теряет свою активность в конъюгате с антигеном, но при образовании ИК с аналитом-антителом не может проявить эту активность (блок В на рис. 48).

Гомогенный ИФА применяется, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций. Существенным его достоинством ИФА является скорость определения – 2-5 мин. Недостаток данного метода — меньшая чувствительность по сравнению с гетерогенным ИФА.

В *гетерогенных вариантах ИФА* исследование проводится в двухфазной системе с участием твердой фазы-носителя. Гетерогенные варианты включают обязательное разделение компонентов реакции

Наиболее важная часть подготовки таких вариантов ИФА – сорбция антигена или антитела на твердой фазе, в качестве которой чаще всего используется планшет из полимерного материала. В дальнейшем к реагенту, «сидящему» на твердой фазе, присоединяется искомый анализ (комплементарные антитело или антиген) при их наличии в исследуемом образце. Наличие и/или содержание такого ИК определяется далее введением в реакционную среду конъюгата и хромогена (рис. 49).

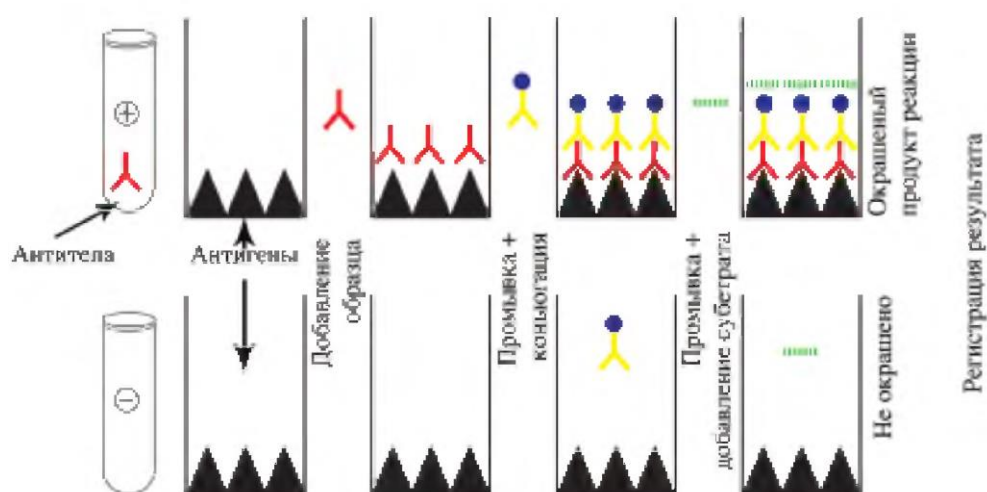


Рис. 49. Принцип гетерогенного ИФА при выявлении в образце антитела (по [26]).

При выявлении в образце антигена используется тот же принцип, только антиген и антитело меняются в схеме местами

В практике КЛД на сегодняшний день наиболее употребительными вариантами ИФА являются варианты гетерогенного ИФА обоих типов.

Оборудование, обычно используемое в ИФА, представлено на рис. 50.



а

б

в

Рис. 50. Оборудование для ИФА

а – шейкер, б вошер, в – спектрофотометр

#### 2.2.2.3.1. Гетерогенные варианты ИФА, основанные на выявлении специфических иммунных комплексов (ИФА I типа)

Все варианты этой группы являются неконкурентными. Когда анализом является антиген, могут быть использованы *сэндвич-метод*, *упрощенный сэндвич-метод* и *усложненный сэндвич-метод*.

##### А) Сэндвич-метод ИФА для выявления антигенов

Это вариант ИФА, в котором на твердом носителе сорбируются антитела к искомому антигену, а в качестве конъюгата используются меченые ферментом антитела к человеческому гамма-глобулину. Его схема представлена на рис. 51.

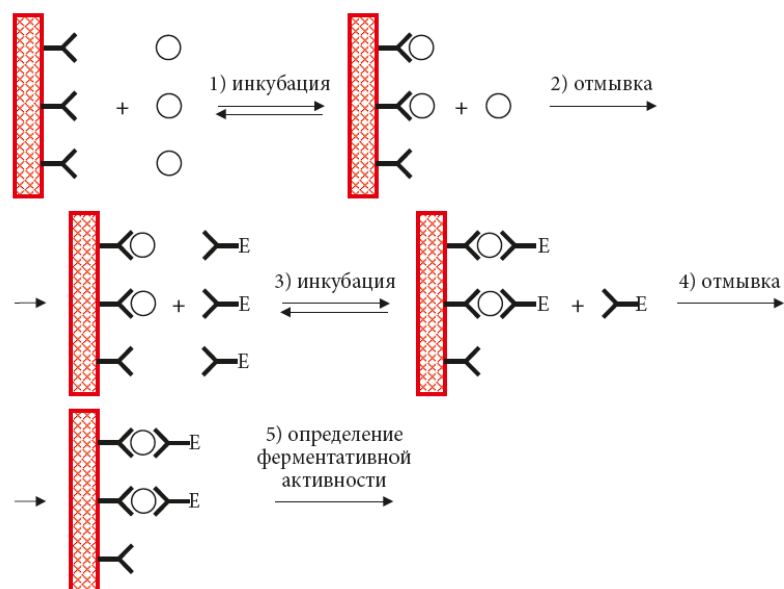


Рис. 51. Схема ИФА в сэндвич-варианте (по [26]).

1. К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе первой инкубации на твердой фазе образуется специфический комплекс  $Ag - Am$ .

2. Носитель отмывают от несвязавшихся молекул антигена и добавляют меченные ферментом антитела (конъюгат).

3. Во время вторичной инкубации происходит связывание конъюгата с антигеном в составе иммунного комплекса.

4. Затем опять следует отмывка для удаления избытка конъюгата.

5. Завершающая стадия — определение ферментативной активности по степени превращения хромогенного субстрата.

Этот вариант назван сэндвич-методом, поскольку антиген как в сэндвиче зажат между молекулами иммобилизованного и меченого антител. Иногда этот вариант называют двухцентровым методом ИФА. Его достоинством является более высокая чувствительность по сравнению с другими вариантами ИФА - предел обнаружения соединений с помощью данного метода достигает  $10^{-21}$  моль/л. Однако сэндвич-метод может быть использован только для выявления тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, два эпитопа. Он непригоден для определения гаптенов.

### *В) Упрощенный сэндвич-метод ИФА для выявления антигенов*

Сэндвич-метод можно упростить, если анализируемый антиген и меченые антитела вводить в реакционную среду одновременно, т.е. заменить двухстадийный вариант одностадийным (рис. 52).

Однако упрощение постановки снижает чувствительность метода, а контакт фермента с реакционной средой может неблагоприятно отражаться на результатах анализа. Кроме того, данная схема налагает дополнительные требования на соотношение концентраций меченых и иммобилизованных антител с целью исключения их конкуренции за связывание с ограниченным числом эпитопов на молекуле антигена, поэтому в анализе целесообразно использование моноклональных антител, специфичных к разным эпитопам антигена.

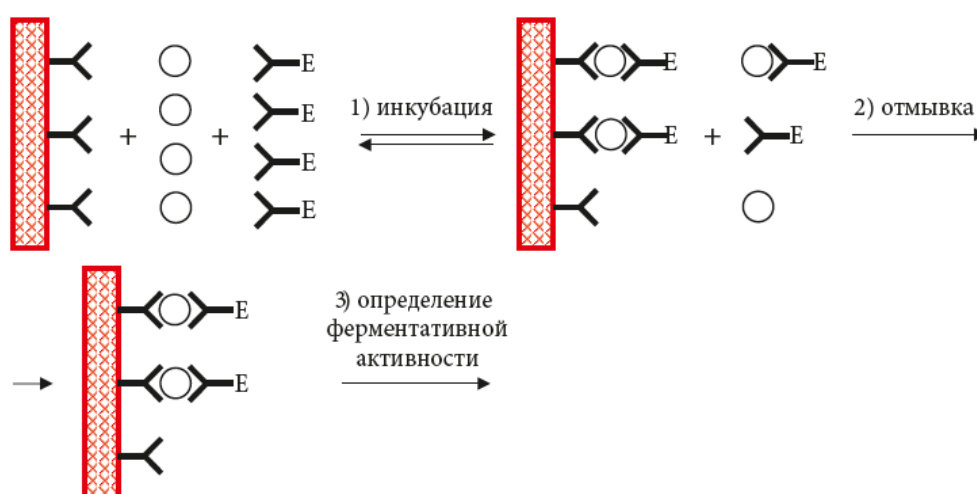


Рис. 52. Схема упрощенного сэндвич-варианта ИФА (по [26]).

### *С) Усложненный сэндвич-метод для выявления антигенов*

Это вариант обычного сэндвич-метода, в котором образование ИК выявляется введением в реакционную среду конъюгата в виде меченых антивидовых антител, в качестве которых используют антитела к глобулинам тех видов животных, от которых получена сыворотка после иммунизации искомым антигеном ,

т.е. сыворотка, содержащая антитела, сорбированные на носителе (рис. 53). Примерами наиболее распространенных «антивидовых» конъюгатов являются меченые антитела кролика, козла, барана, осла против иммуноглобулинов человека.

Достоинством данного метода, несмотря на его многостадийность и относительную длительность постановки, является универсальность антивидового конъюгата, который может быть применен для выявления различных антигенов.

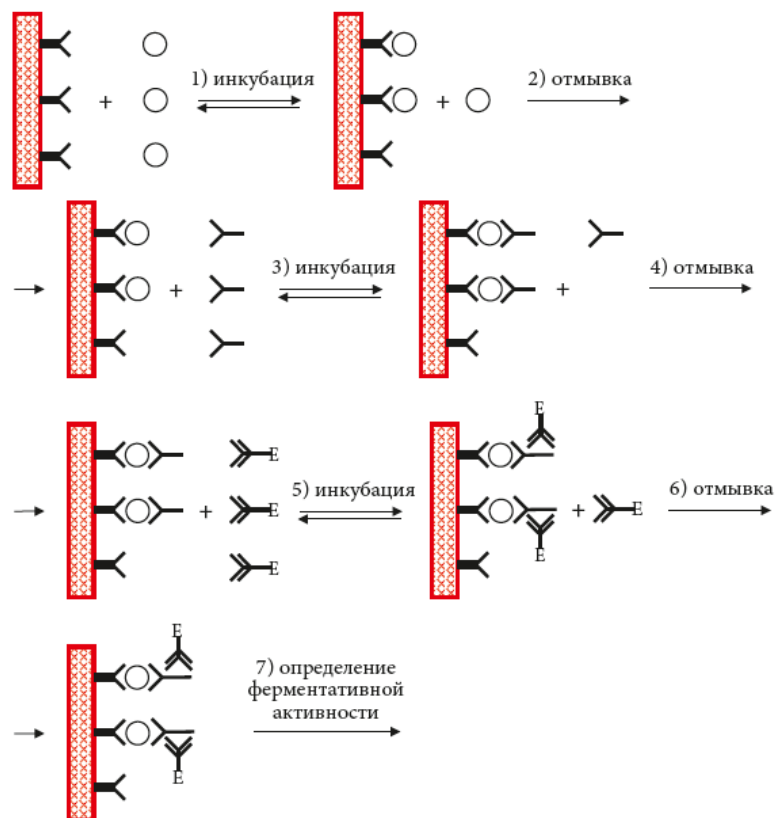


Рис. 53. Усложненный сэндвич-метод ИФА (по [26]).

В тех случаях, когда анализом является антитело, могут быть использованы также три варианта гетерогенного ИФА I типа, все они относятся к неконкурентным вариантам ИФА.

*D) ИФА I типа для определения антител непрямым методом с использованием меченых вторичных антител и иммобилизованных антигенов*

К иммобилизованному на носителе антигену добавляют исследуемую сыворотку, после инкубации и удаления несвязанных компонентов выявляют специфические ИК с помощью меченных ферментом антивидовых антител (непрямой метод) (рис. 54).

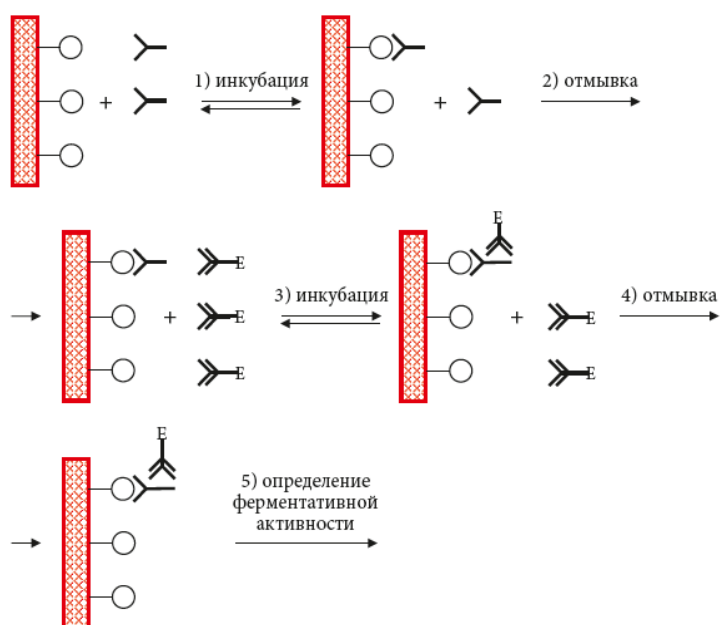


Рис. 54. Схема ИФА I типа для определения антител с использованием меченых вторичных антител и иммобилизованных антигенов (непрямой метод) (по [26]).

Данная схема является одной из наиболее распространенных в иммуноферментном анализе антител, так как обладает всеми достоинствами сэндвич-метода, но отличается от него универсальностью меченого реагента, что дает возможность выявлять антитела к разным антигенам. Такой подход позволяет решать проблемы серодиагностики заболеваний человека и животных, используя ограниченный набор антивидовых иммуноферментных конъюгатов, что значительно облегчает задачу производства реагентов для ИФА.

*Е) ИФА I типа для определения антител с использованием меченого антигена и иммобилизованного антигена*

Исследуемую пробу инкубируют с иммобилизованным на носителе антигеном и после отмывки несвязавшихся компонентов вносят в реакционную среду

меченый ферментом антиген. После инкубации и отмывки несвязанных компонентов выявляют образовавшиеся на первой стадии ИК с помощью ферментативной реакции (рис. 55).

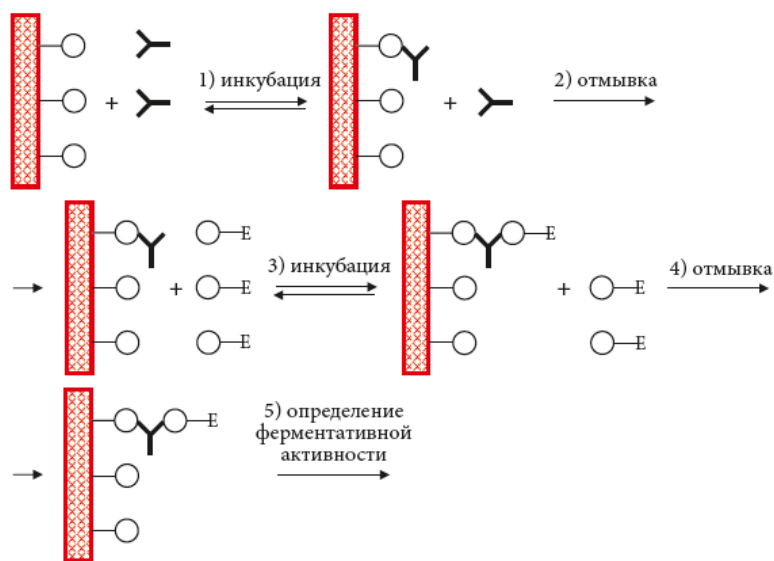


Рис. 55. Схема ИФА I типа для определения антител с использованием меченого антигена и иммобилизованного антигена (по [26]).

*G) ИФА I типа для определения антител с использованием меченого антигена и иммобилизованных антивидовых антител*

При наличии в образце искомых антител иммобилизованные на носителе антивидовые антитела образуют с ними комплекс антител, который выявляется введением в реакционную среду соответствующего меченого ферментом антигена (рис. 56). Вариант основан на выявлении из множества связавшихся с иммуносорбентом антител молекул только одной специфичности, поэтому возможность его эффективного применения снижается при способности меченого антигена к неспецифическому связыванию с иммобилизованными на носителе белками или адсорбировавшимися на них после первой инкубации иммуноглобулинами.



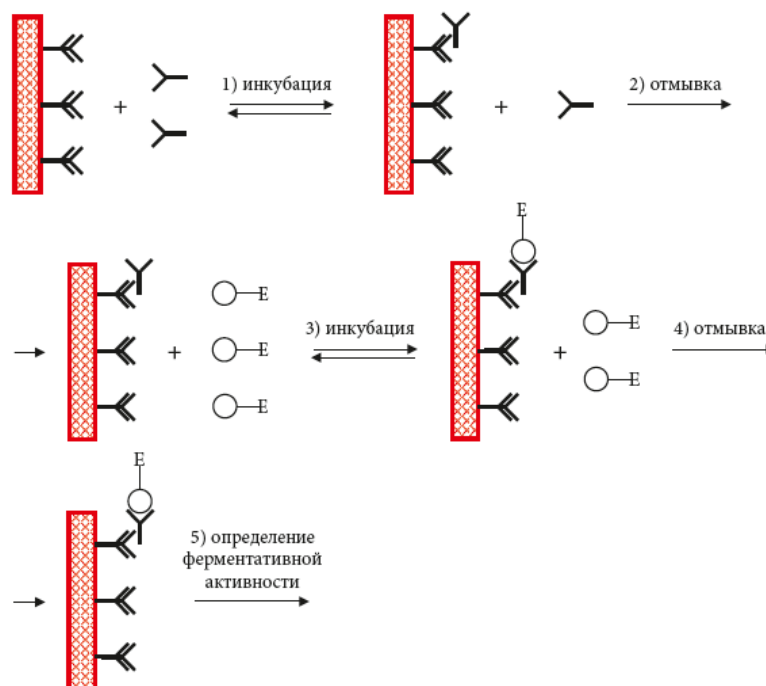


Рис. 56. Схема ИФА I типа для определения антител с использованием меченого антигена и иммобилизованных антивидовых антител (по [26]).

\*\*\*

В методах ИФА I типа от концентрации анализата в пробе прямо зависит интенсивность регистрируемого сигнала. Эта зависимость отражается графиком, который строится по результатам исследования входящих в набор калибраторов – реагентов с известными концентрациями анализата (рис. 57).



Рис. 57. Калибровочный график зависимости уровня регистрируемого сигнала от концентрации анализируемого вещества (по [26]).

#### *2.2.2.3.2. Гетерогенные варианты ИФА, основанные на выявлении оставшихся свободными центов специфического связывания (ИФА II типа)*

По сравнению с ИФА I типа эта группа вариантов значительно больше, она включает как неконкурентные, так и конкурентные варианты, каждый из которых в зависимости от того, какой реагент используется на первой стадии (иммобилизованный или растворимый), включает и чисто гетерогенный твердофазный ИФА, и гомогенно-гетерогенный ИФА.

*А) Неконкурентный ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченых специфических антител и иммобилизованного антигена*

В нем используется гомогенно-гетерогенный ИФА, поскольку на первой стадии анализируемый образец смешивают с раствором, содержащим фиксированное количество меченых ферментом специфических антител (рис. 58). После инкубации и образования специфических ИК раствор вносят в лунки планшета для ИФА, в которых сорбирован искомым антиген, связывающийся с оставшимися несвязанными мечеными антителами. После отмывки определяют ферментативную активность на носителе. В литературе этот метод иногда называют *иммуноферментометрическим*.

При использовании этого варианта следует учитывать, что с иммобилизованным на носителе антигеном могут связываться не только свободные меченые антитела, но и антитела, провзаимодействовавшие с антигеном только одним активным центром, особенно в случае антигена малых размеров. Другим недостатком данного метода является контакт ферментной метки с анализируемым образцом, что может вызвать изменение ферментативной активности.

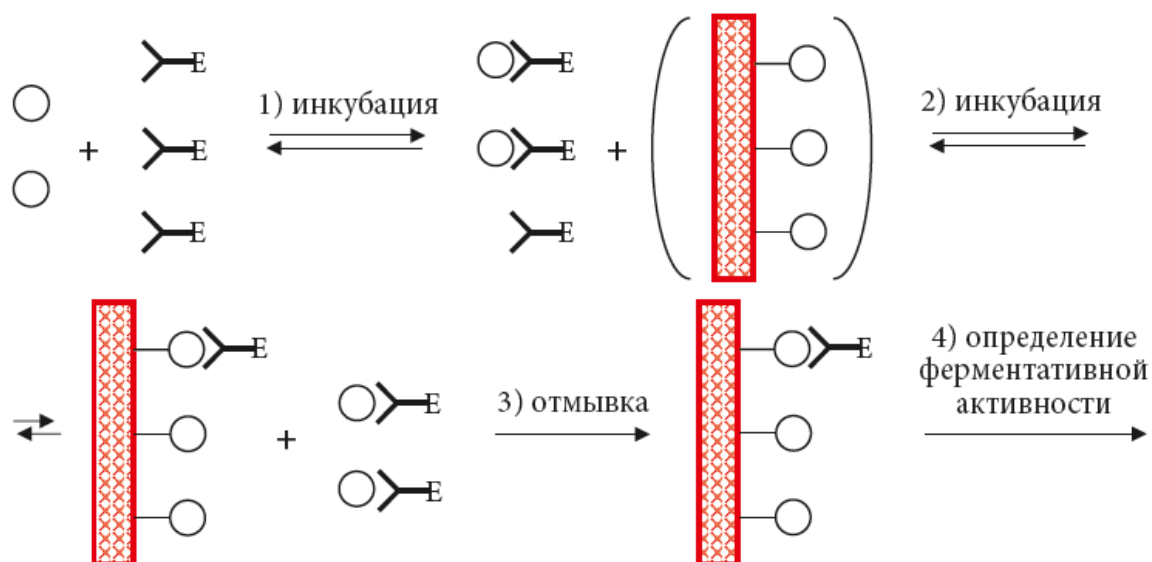


Рис. 58 Схема неконкурентного ИФА для определения антигенов с использованием меченых специфических антител и иммобилизованного антигена (по [26]).

*В) Неконкурентный ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченых вторичных антител и иммобилизованного антигена*

Данный вариант также относится к гомогенно-гетерогенным и имеет сходные черты с предыдущим вариантом (рис. 59), отличаясь от него тем, что на первой стадии используются немеченые специфические антитела, а образующийся на твердой фазе комплекс выявляют с использованием меченых вторичных антител. По сравнению с предыдущим вариантом данный вариант требует больше времени для постановки, но в нем исключается контакт исследуемого образца с ферментной меткой; кроме того, можно использовать один и тот же антивидовой конъюгат для анализа различных антител.

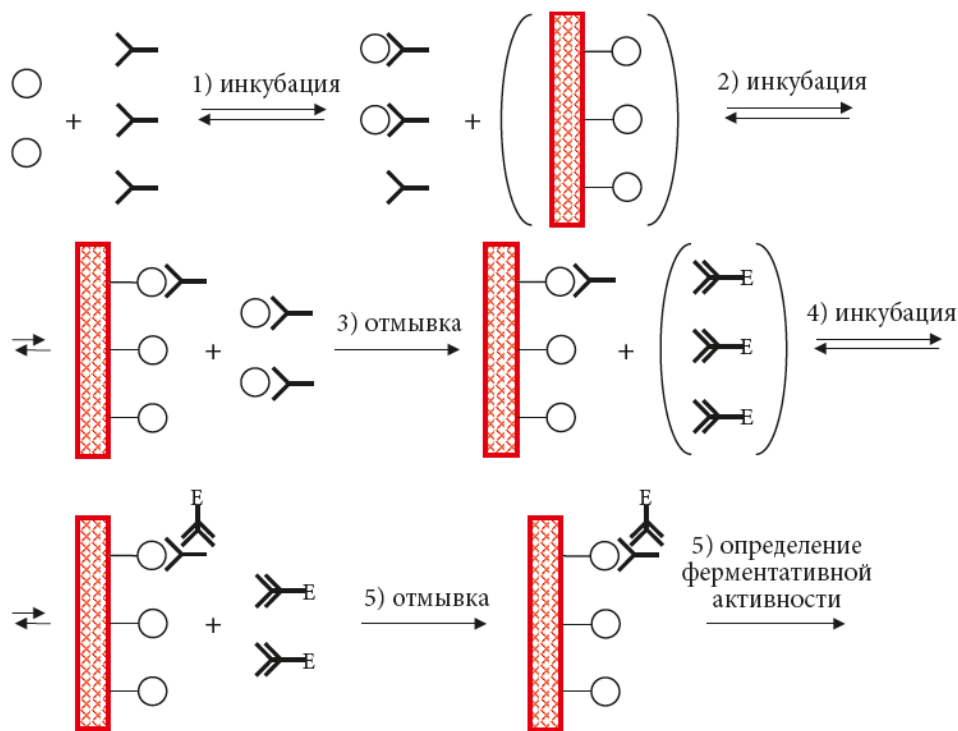


Рис. 59. Схема неконкурентного ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченых вторичных антител и иммобилизованного антигена (по [26]).

*С) Неконкурентный ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных антител (метод последовательного насыщения)*

Данный вариант относится к твердофазным ИФА. Иммобилизованные на носителе (в лунках планшета для ИФА) антитела инкубируют с раствором, содержащим определяемый антиген. После отмывки в лунки добавляют меченный ферментом антиген, который взаимодействует со свободными антигенсвязывающими центрами антител (рис. 60). Длительность этого анализа обусловлена в основном длительностью первой стадии, которую целесообразно проводить в равновесном режиме. Этот вариант позволяет предотвращать влияние исследуемого образца на активность фермента, так как вторая стадия проводится после отмывки иммуносорбента.

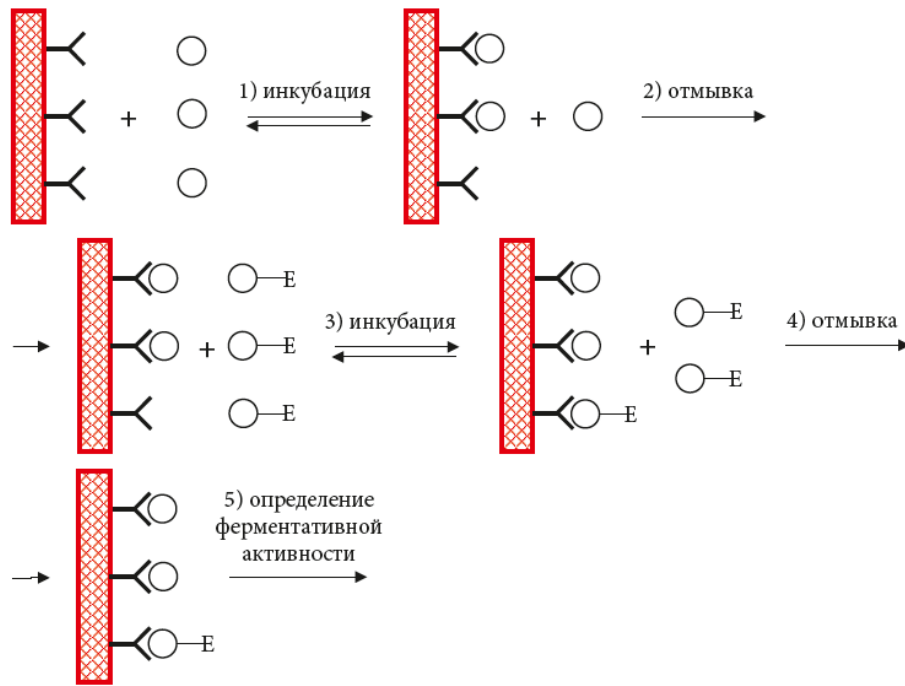


Рис. 60. Схема неконкурентного ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных антител (метод последовательного насыщения) (по [26]).

*D) Неконкурентный ИФА II типа для определения антител с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена.*

К носителю с иммобилизованным антигеном добавляют анализируемый раствор. После установления в системе равновесия и частичного связывания анализируемых антител с носителем несвязанные антитела отмывают. Затем добавляют меченые антитела той же специфичности, которые взаимодействуют с оставшимися несвязанными антигенами на носителе (рис. 61).

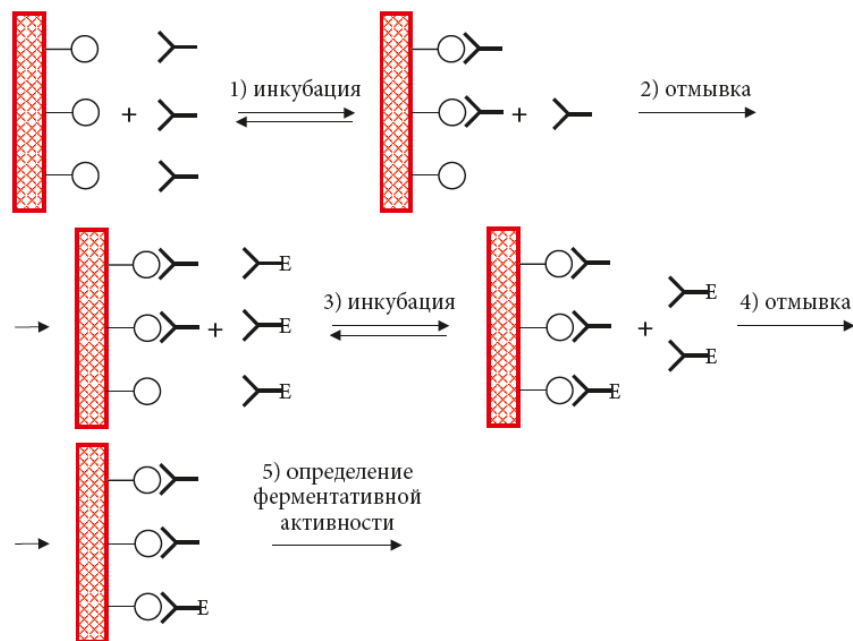


Рис. 61. Схема неконкурентного ИФА-определения антител с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена (по [26]).

*Е) Конкурентный ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена*

В лунки носителя (планшета для ИФА) с иммобилизованным антигеном вносят раствор определяемого антигена и раствор, содержащий фиксированное количество меченых ферментом специфических антител. После инкубации и отмывки несвязанных с носителем компонентов определяют ферментативную активность на носителе. Время анализа зависит в основном от продолжительности инкубации (рис. 62).

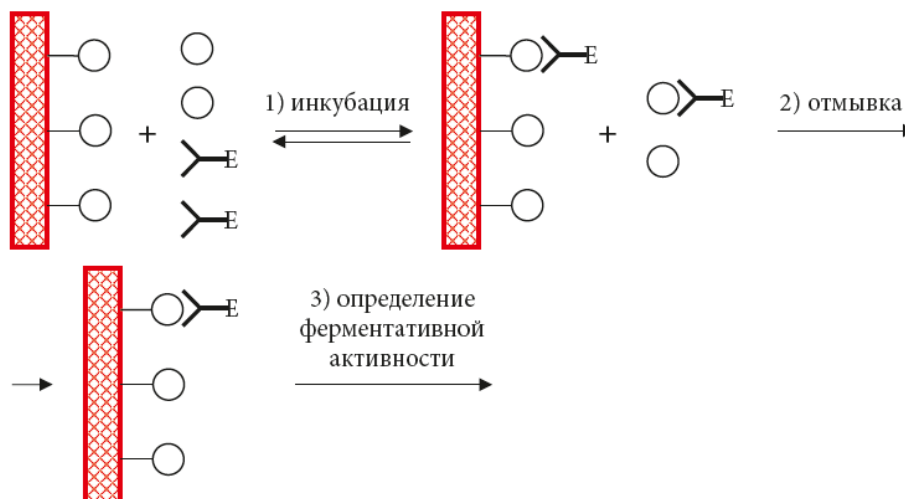


Рис. 62. Схема конкурентного ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена (по [26]).

Поскольку фермент-маркер контактирует со средой образца, это может ограничивать применение данного варианта при анализе биологических жидкостей (сыворотки крови, экстрактов тканей и т. п.), способных ингибировать или, наоборот, активировать фермент. Данный вариант иногда называют *ингибиторным ИФА*.

*G) Конкурентный ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных антител*

В этом варианте к иммобилизованным на носителе антителам добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген и фиксированную концентрацию меченых антигенов. После инкубации несвязанные свободные и меченые антигены отмывают и регистрируют ферментативную активность на носителе (рис. 63).

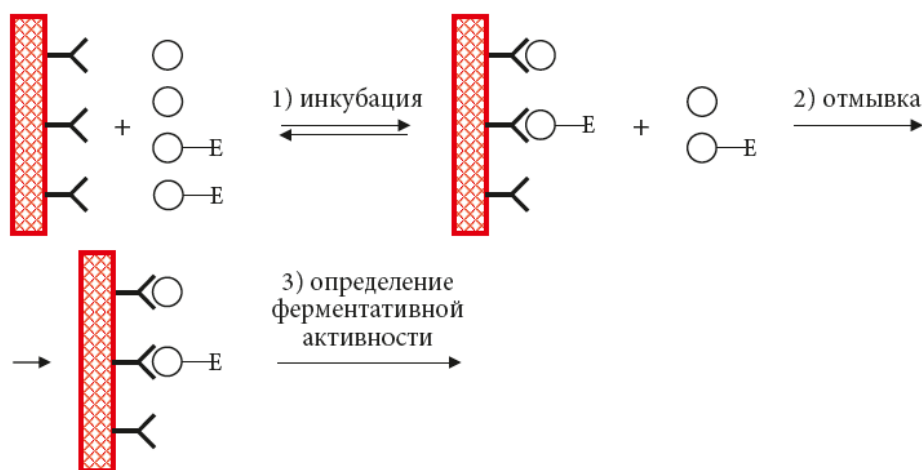


Рис. 63. Схема конкурентного ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных антител (по [26]).

К преимуществам данного варианта следует отнести его одностадийный характер, что облегчает автоматизацию анализа. Недостатками являются сложность получения антигенных конъюгатов, особенно низкомолекулярных, и возможное влияние компонентов анализируемой биологической жидкости на активность фермента в конъюгате.

*Н) Конкурентный ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных вторичных антител*

Это вариант гомогенно-гетерогенного ИФА. Первая стадия взаимодействия специфических антител с определяемым и меченым антигенами происходит в растворе. После установления в системе равновесия раствор вносят в лунки носителя – планшета для ИФА с иммобилизованными вторичными антителами, которые сорбируют образовавшиеся на первой стадии ИК. После отмывки несвязавшихся компонентов определяют ферментативную активность на носителе (рис. 64). В литературе этот вариант часто называют *методом двойных антител*.



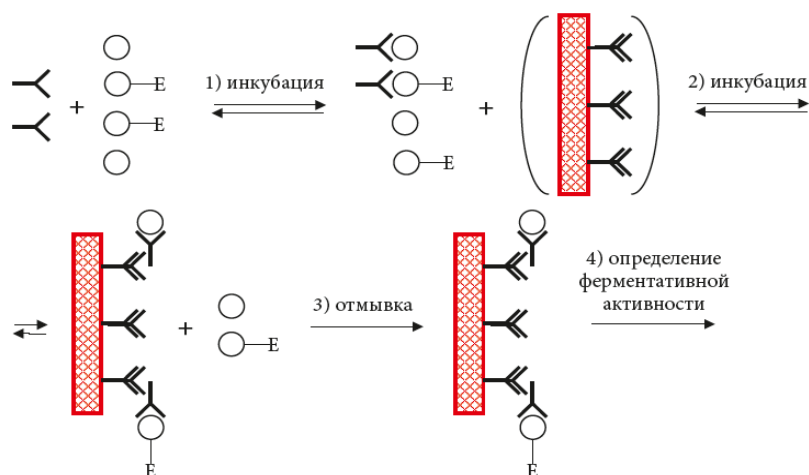


Рис. 64. Схема конкурентного ИФА II типа для определения антигенов с использованием меченого антигена и иммобилизованных вторичных антител.

*1) Конкурентный ИФА II типа для определения антител с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена.*

К иммобилизованному антигену добавляют анализируемый раствор, содержащий фиксированное количество меченных ферментом антител. После установления в системе равновесия несвязавшиеся компоненты отмывают и определяют ферментативную активность на носителе.

Необходимым условием проведения анализа является нахождение иммобилизованного антигена в недостатке по отношению к суммарному количеству свободных и меченых антител в растворе. Так же, как и в отношении всех конкурентных методов, не исключается контакт ферментной метки с компонентами биологической жидкости, что накладывает дополнительные условия на выбор фермента (рис. 65).

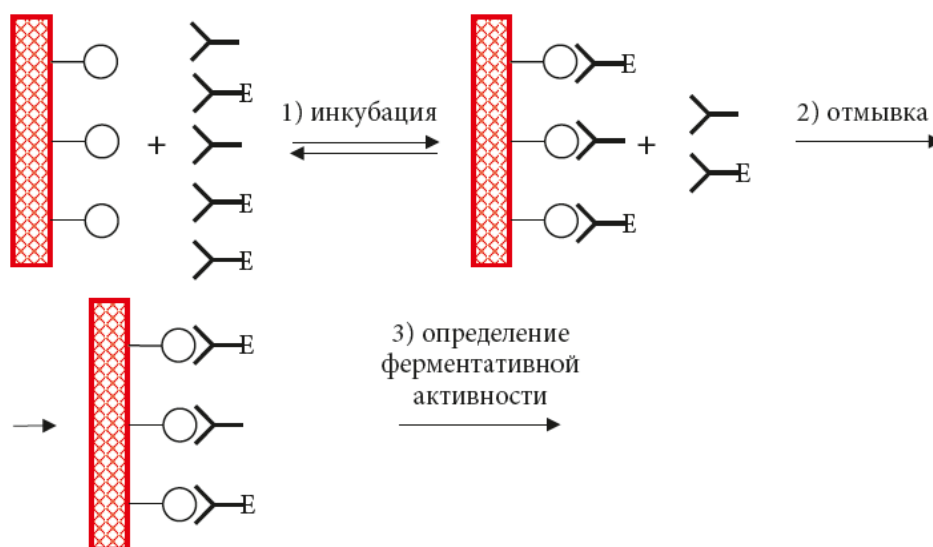


Рис. 65. Схема конкурентного ИФА II типа для определения антител с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена (по [26]).

\*\*\*

Для вариантов ИФА, основанных на определении свободных центров специфического связывания, калибровочная кривая, в отличие от вариантов I типа, описывает уменьшение регистрируемого сигнала от максимального значения, соответствующего нулевой концентрации антигенов, до определенного уровня, характеризующего концентрацию исследуемого антигена (рис. 66).



Рис. 66. Калибровочный график зависимости уровня регистрируемого сигнала от концентрации анализируемого вещества для определения оставшихся свободных центров специфического связывания (по [26]).

\*\*\*

В учебном пособии по иммуноанализу Н.Е. Максимовой с соавт. [26] указаны особенности схем проведения гетерогенных методов ИФА, которые, по нашему мнению, полезно учитывать всем специалистам, имеющим отношение к производству и использованию иммунохимических тестов для КЛД.

Приводим их дословно:

«Гетерогенные методы ИФА имеют как достоинства, так и недостатки. Несмотря на разнообразие этих методов, универсального метода для определения любых соединений не существует. Выбор метода анализа зависит от ряда факторов, из которых основными являются:

- молекулярная масса и валентность антигена;
- длительность анализа;
- состав исследуемой среды;
- свойства ферментов.

Для получения конъюгатов необходимо выделить достаточное количество антигена в очищенном виде, что не всегда осуществимо.

Разнообразие строения и физико-химических свойств антигенов не позволяет разработать универсальный способ введения ферментной метки в молекулу антигена. Проблема усложняется по мере уменьшения его молекулярной массы и растворимости. По сути, получение большинства антигенферментных конъюгатов всякий раз представляет собой самостоятельную конкретную задачу.

Основной проблемой, стоящей особенно остро при введении ферментной метки в низкомолекулярные соединения, является доступность антигенных детерминант в образовавшемся конъюгате для взаимодействия с антителами. При использовании меченых гаптенов необходимо, чтобы связь фермента с ним осуществлялась через ту же функциональную группу, которая была задействована при синтезе конъюгата гаптена с белком для целей иммунизации животного при получении специфических антител. Это предъявляет дополнительные требования к выбору фермента-маркера.

Получение меченых антител — более простая задача. Методы синтеза и очистки конъюгатов с различными иммуноглобулинами в настоящее время хорошо разработаны и унифицированы. С помощью имеющихся стандартных методик получают активные и стабильные препараты, что упрощает разработку методов иммуноферментного анализа различных соединений.

Вместе с тем на ряд антигенов трудно подобрать высокоаффинные антитела. К тому же получение меченых специфических антител в количествах, обеспечивающих потребности массового анализа, затрудняется многообразием антигенов.

В связи с этим применение в анализе меченых антивидовых антител упрощает процедуру получения реагентов для анализа, так как позволяет, используя одни и те же конъюгаты, осуществлять определение разных антигенов и антител разной специфичности.

При сравнении конкурентных и неконкурентных методов можно отметить следующее. Во-первых, конкурентные методы обладают меньшей чувствительностью по сравнению с неконкурентными. Предел обнаружения различных соединений неконкурентными методами ограничен только чувствительностью регистрации ферментной метки, а для конкурентных методов — еще и аффинностью антител. Во-вторых, еще одним недостатком конкурентных методов иммуноферментного анализа является возможное влияние компонентов анализируемых биологических жидкостей на каталитические свойства ферментной метки. Во многих случаях подобный эффект может быть устранен путем многократного разведения исходного образца. Однако возможность его разведения зависит от содержания исследуемого соединения, что должно быть устранено при выборе метода ИФА.»

#### ***2.2.2.4. Модификации ИФА***

Все варианты ИФА позволяют определять в одной постановке только один аналит — конкретные антитела или конкретный антиген. Дальнейшее развитие

метода позволило разработать варианты анализа, позволяющие в одной постановке определять наличие в образце антител к различным антигенам одного и того же патогена или к отдельным антигенам нескольких патогенов.

Таковыми модификациями ИФА являются *иммуноблоттинг* и *иммунохроматография*.

#### 2.2.2.4.1. Иммуноблоттинг

*Иммуноблоттинг* (ИБ, от англ. *blot* – пятно) – это определение наличия в исследуемом образце антител к различным антигенам патогена, которые в определенном порядке нанесены на специальную мембрану.

Эта мембрана, разрезанная на полоски (стрипы), является местом последующего взаимодействия со специфическими антителами (аналитами) образца, конъюгатом - антителами к человеческим глобулинам, мечеными, ферментом, субстратом этого фермента и хромогеном, окрашивающим зоны выявленных ИК

В зависимости от способа нанесения антигенов ИБ делится на «Вестерн-блот», при котором на мембрану наносятся все антигены патогена, разделенные методом электрофореза в геле (при этом они распределяются по мембране соответственно своей молекулярной массе), и «Лайн-блот», при котором клинически значимые (нативные, синтетические или рекомбинантные антигены) на мембрану в виде полос, размещение которых определяется только соображениями удобства чтения результатов теста,; при этом на мембрану могут наноситься антигены различных патогенов.

Процедура подготовки и проведения ИБ в формате «Вестерн-блот» состоит из нескольких этапов (см. рис. 67).

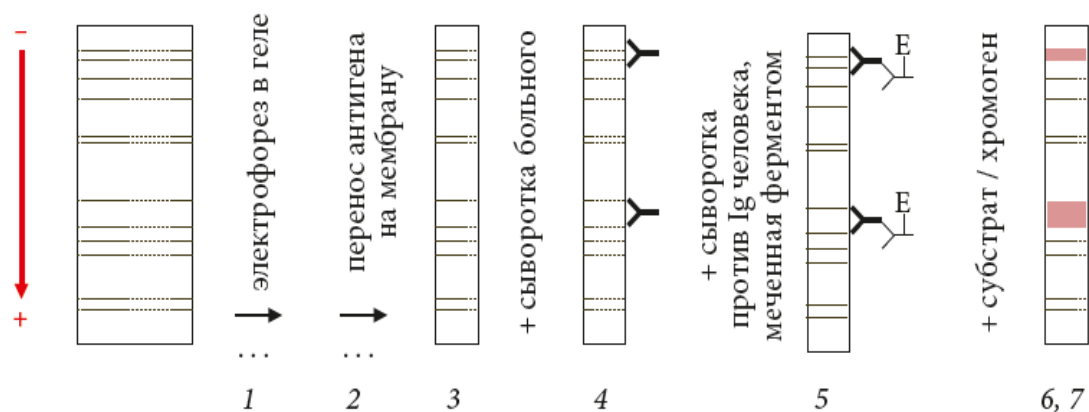


Рис. 67. Этапы подготовки и постановки постановки ИБ в формате «Вестерн-блот» (по [26])

Подготовка: 1 — разделение антигенов электрофорезом (пропорционально размеру); 2 — перенос антигенов на мембрану; 3 — разрезание мембраны на стрипы (полоски, содержащие весь спектр антигенов)

Постановка: 4 — обработка стрипа исследуемой сывороткой (специфические антитела связываются с соответствующими антигенами); 5 — выявление связавшихся антител антивидовыми антителами, меченными ферментом; 6 — внесение субстрата и проявление образовавшихся ИК (при связывании специфических антител с антигенами в местах связывания образуются пятна); 7 — учет реакции (сравнение результата с положительным и отрицательным контролями).

Процедура подготовки ИБ в формате «Лайн-блот» значительно отличается от описанной. В ней нет ни электрофореза антигенов в геле, ни их переноса на мембрану. Готовые растворы антигенов, приготовленные, как правило, из коммерческих препаратов последних, специальными перьями наносятся параллельными линиями на мембрану. При чем, как отмечено выше, это могут быть и нативные (природные) антигены и их рекомбинантные и синтетические аналоги.

Дальнейшие этапы процедуры подготовки и проведения обоих форматов ИБ уже совпадают - готовая к использованию мембрана режется на полоски (стрипы), которые проходят все перечисленные для формата «Вестерн-блот» этапы постановки.

До появления формата «Лайн-блот» ИБ был наиболее употребителен в КЛД как тест подтверждения наличия в крови пациента антител к какому-то патогену (как правило, речь шла о диагностике инфекционной патологии), выявленных до этого более простыми и, соответственно, более дешевыми скрининговыми методами (ИФА, РИФ). Т.е., несмотря на более высокую информативность и достоверность результатов, ИБ в формате «Вестерн-блот» не мог претендовать на более широкое применение, в частности для массового скрининга.

Ситуация в корне изменилась с появлением ИБ в формате «Лайн-блот». Существенно меньшая себестоимость производства соответствующих наборов реагентов и возможность в одной постановке оценивать наличие в исследуемых образцах антител не только к различным антигенам одного и того же патогена, но и к антигенам различных патогенов делают этот тест пригодным даже для скрининговых исследований сразу на группу инфекций.

#### *2.2.2.4.2. Иммунохроматография*

*Иммунохроматографический анализ (ИХА)* представляет собой иммунохимический метод, основанный на сочетании тонкослойной хроматографии и ИФА с использованием современных технологий получения моноклональных и поликлональных антител к специфическим антигенам.

Он проводится с помощью специальных тест-полосок (см. рис. 68), панелей или тест-кассет. Тест-полоска для ИХА состоит из следующих основных элементов: пластиковой подложки, на которую наклеены все остальные компоненты теста; фильтра (прокладки для образца); прокладки или мембраны для конъюгата; хроматографической нитроцеллюлозной мембраны, содержащей одну или несколько зон захвата иммунных комплексов и контрольную зону захвата; мембраны абсорбции (впитывающей прокладки). Тест-полоска может быть помещена в пластиковый корпус, в котором имеются приемное и тестовое «окна».

ИХА — это качественный скрининговый предварительный метод, позволяющий быстро, в течение нескольких минут, выявить наличие определенных веществ в биологических материалах (моче, цельной крови, сыворотке или

плазме крови, слюне и т. д.) в любых условиях, в том числе «полевых». Он имеет относительно невысокую чувствительность, но при этом он крайне прост в исполнении и учете результатов, который осуществляется визуально и не требует дополнительного оборудования и высокой квалификации исполнителя, т.е. в стационаре он может выполняться непосредственно у постели пациента. Особенно удобен этот метод в условиях поликлиники.

В литературе ИХА нередко именуется *методом сухой иммунохимии, стрип-тестом, экспресс-тестом или экспресс-анализом.*

При постановке ИХА исследуемый образец (цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, моча, экстракт тканей или фекалий), нанесенный на специальный участок тест-полоски, движется по мембране и доходит до зоны, где находятся специфически связывающиеся агенты (антитела или антигены) и при наличии в образце искомого анализата он связывается со специфическими антителами к нему. При этом на мембране появляются одна или две четко окрашенные полосы, свидетельствующие о негативном или позитивном результате теста (конкретная информация – в инструкциях к каждому тесту). Для визуализации комплексов “антиген-антитело” используются конъюгированные красители на основе коллоидного золота.



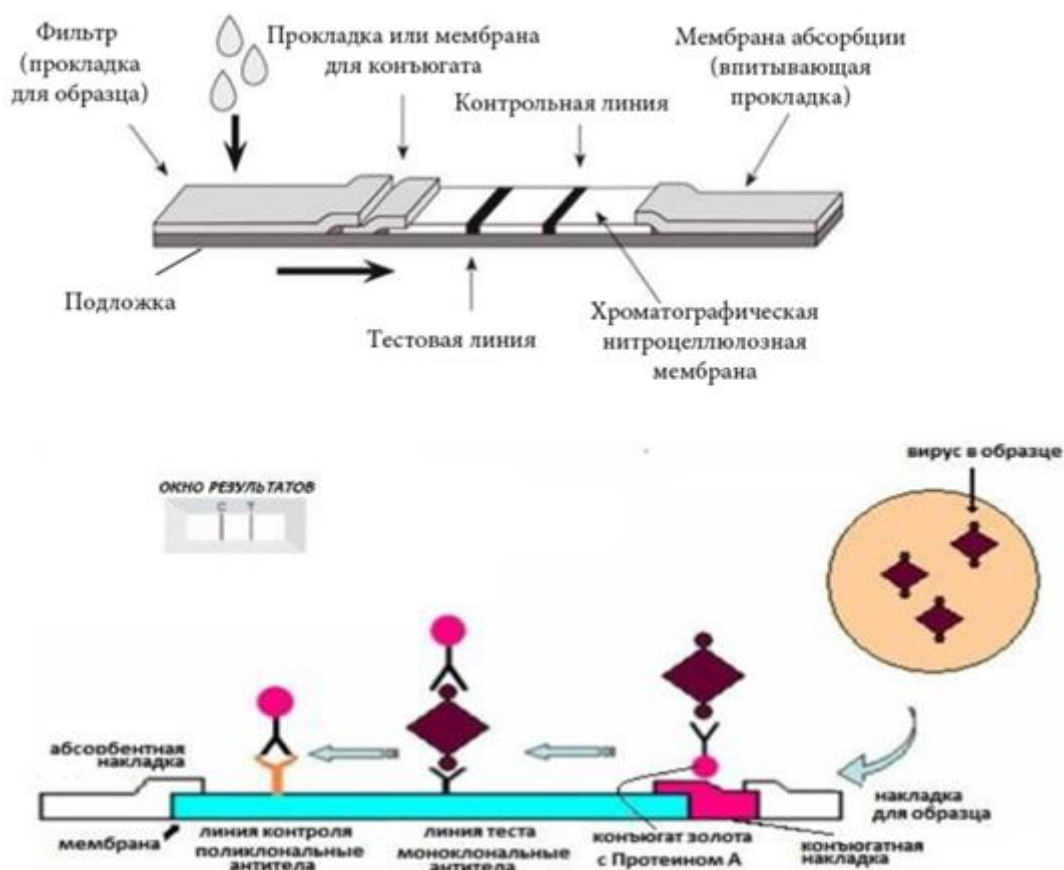


Рис. 68. Общий вид и схема строения тест-полоски для иммунохроматографии (по [26, 38]).

Существует два варианта ИХА – *прямой (сэндвич-метод)* и *непрямой конкурентный*.

В *прямом ИХА (сэндвич-метод)* используются меченые моноклональные антитела к искомому анализу, иммобилизованные на мембране (конъюгат). На тестовой линии иммобилизованы поликлональные антитела к искомому анализу, а на контрольной линии – поликлональные антивидовые антитела, специфические к первичным антителам (рис. 69).

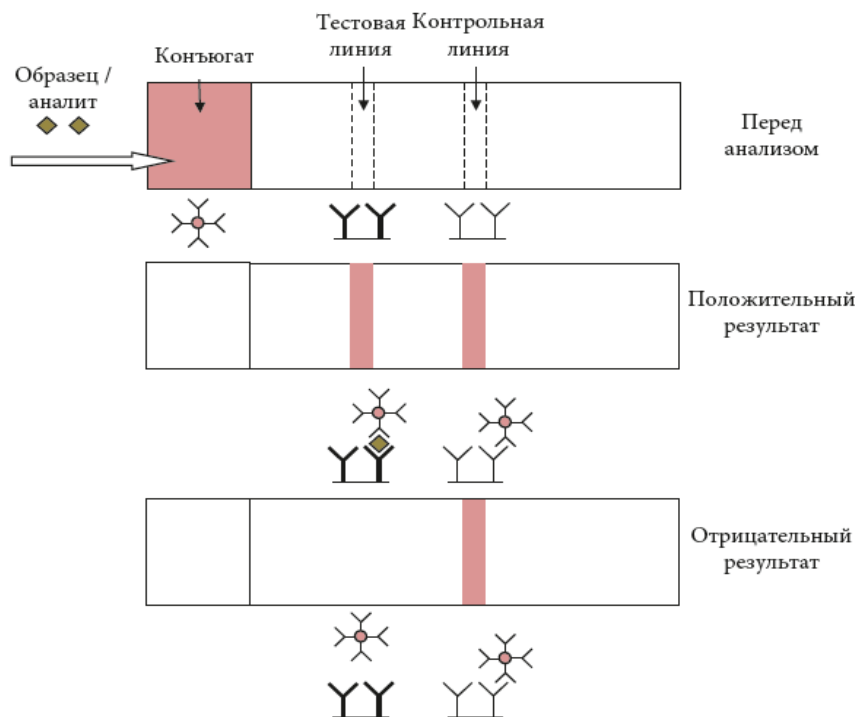


Рис. 69. Схема прямого (сэндвич-метода) ИХА (по [26]).

При попадании образца, содержащего искомый аналит, на мембрану с конъюгатом происходит связывание аналита с конъюгатом. Затем иммунный комплекс попадает в тестовую зону, где он связывается со специфическими антителами, образуя “сэндвич” (антитело-антиген-антитело-метка). Избыток несвязавшегося конъюгата связывается с антивидовыми антителами на контрольной линии. Таким образом, выявление двух линий на тест-полоске является положительным результатом теста.

При отсутствии аналита в образце конъюгат связывается с антивидовыми антителами только на контрольной линии, образуя одну линию на тест-полоске. Метод прямого ИХА используется для выявления высокомолекулярных соединений – вирусов, различных гормонов (например, в тестах на беременность), возбудителей бактериальных инфекций. Он не подходит для определения низкомолекулярных веществ, так как для образования сэндвича «антитело-антиген-антитело» у антигена должны быть по крайней мере две антигенные детерминанты для связывания с антителом.

Для определения низкомолекулярных соединений (в том числе метаболитов наркотических соединений в моче, жидкости ротовой полости, экстрактах тканей) используется *непрямой конкурентный ИХА*, который основан на конкуренции аналита и иммобилизованного конъюгата «аналит-белок-носитель» за ограниченное количество центров связывания специфических антител, содержащихся в конъюгате «антитело к аналиту- метка». Устройство тест-полоски в этом случае отличается тем, что в тестовой зоне иммобилизованы искусственные антигены (конъюгат «антиген-белок-носитель»), способные специфически связываться со свободными антителами. При нанесении образца, содержащего аналит, он связывается на мембране с конъюгатом «антитело к аналиту-метка». Далее ИК проходит через тестовую зону, где иммобилизован конъюгат «аналит-белок-носитель». ИК не может связаться с этим конъюгатом, поскольку низкомолекулярные соединения обычно имеют одну антигенную детерминанту и, соответственно, антитела имеют один центр связывания с антигеном, который уже занят аналитом. Далее ИК связывается с антивидовыми антителами, находящимися на контрольной линии. В итоге, положительным результатом теста становится отсутствие окрашенной полосы в тестовой зоне и наличие такой полосы в контрольной зоне. При отсутствии искомого аналита в образце конъюгат «антитело к аналиту- метка» частично связывается в зоне тестовой линии с конъюгатом «антиген-белок-носитель», а несвязавшийся попадает в зону контрольной линии и связывается там с антивидовыми антителами. В итоге наличие двух окрашенных линий (тестовой и контрольной) является отрицательным результатом анализа (рис. 70).

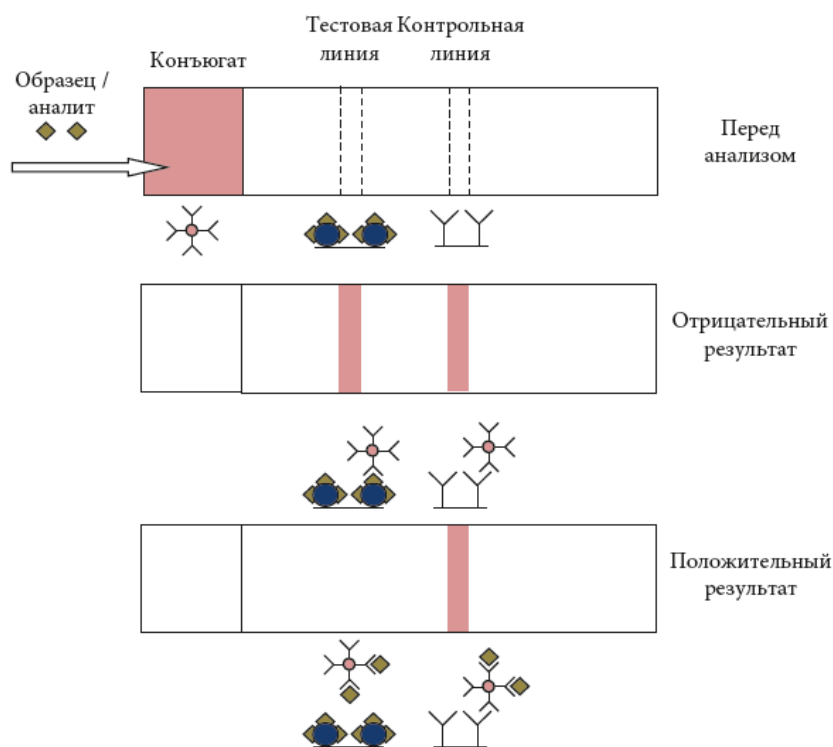


Рис. 70. Схема непрямого конкурентного иммунохроматографического анализа (по [26]).

При всех достоинствах ИХА следует отметить и его недостатки в плане надежности, чувствительности и экономичности тестов. Надежность и чувствительность зависят, во-первых, от качества используемых в тесте моноклональных антител, а во-вторых — от концентрации антигена в биоматериале. Тест-полоски для ИХА имеют сложное строение, и процесс разработки технологии производства ИХА-тестов является процессом наукоемким, высокотехнологичным и многостадийным.

#### 2.2.2.4.3. Мультиплексный дот-иммуноанализ

В последние годы получила развитие еще одна модификация ИФА - мультиплексный<sup>8</sup> дот-иммуноанализ<sup>9</sup>. Строго говоря, это направление можно считать модификацией модификации ИФА – иммуноблоттинга в формате «Лайн-блот».

<sup>8</sup> Мультиплексный анализ – одновременная оценка наличия различных аналитов в одном и том же биологическом образце.

<sup>9</sup> Дот-иммуноанализ – точечный иммуноанализ (от англ. dot – точечный)

Развитие технических средств иммунохимической диагностики позволяет заменить стрипы для ИБ биочипами самых различных форматов, т. е. перейти от использования макроформатных тестов к их микроформатным вариантам, позволяющим решать, по сути, ту же задачу – оценку в одной постановке наличия в исследуемом образце ряда аналитов, но с принципиально иными количественными характеристиками метода – существенно бóльшими числами определяемых аналитов и существенно меньшими объемами исследуемых образцов и используемых реагентов.

Однако при всей перспективности этого направления развития иммунохимических методов КЛД, время его использования в работе большинства клинических лабораторий, к сожалению, еще не наступило, что связано, по-видимому, как со сложностями его технического обеспечения, так и со значительно более высокими требованиями к технологической дисциплине производства и применения соответствующих тестов, сравнительно с теми, что на сегодня считаются вполне достаточными для обеспечения эффективной работы действующих производств средств КЛД и самих клинических лабораторий.

\*\*\*

Приведенные в главе 2.2. характеристики различных иммунохимических реакций, которые можно наблюдать *in vitro* и которые могут быть использованы в практике КЛД, разумеется, не могут и не должны рассматриваться как исчерпывающие рекомендации по их применению. Все их описания просто должны давать читателю достаточно ясное представление об особенностях механизмов реализации реакций «антиген-антитело», лежащих в основе соответствующих диагностических тестов и об основных практических приложениях этих тестов.

### *Контрольные вопросы*

- 1. Основные типы иммунодиагностических реакций?*
- 2. Что такое реакция агглютинации, ее варианты, используемые в КЛД?*
- 3. Обязательные компоненты постановки РА?*

4. *Что такое реакция преципитации, ее варианты, используемые в КЛД?*
5. *Особенности реакции нейтрализации?*
6. *Реакции иммунного лизиса?*
7. *Что такое радиоиммунный анализ, его варианты, используемые в КЛД?*
8. *Что такое радиоиммунный анализ, его варианты, используемые в КЛД?*
9. *Что такое иммуноферментный анализ, его варианты, используемые в КЛД?*
10. *Модификации иммуноферментного анализа?*

## 2.3. Методы регистрации и учета результатов иммунодиагностических реакций

[25, 53]

Термины «регистрация» и «учет» нередко употребляются как синонимы, что не вполне корректно, поскольку проявления реакции «антиген-антитело» вначале отмечаются, т.е. *регистрируются* или невооруженным глазом, или с использованием лупы или агглютиноскопа, или каким-либо прибором, измеряющим изменения реакционной среды<sup>10</sup>, а *учитываются*, как *результат реакции* только после сопоставления полученных при *регистрации* показателей с какими-то оценочными критериями.

При этом результаты иммунохимических реакций могут учитываться как *качественно (альтернативно)*, т.е. по принципу «*да (положительный результат - в образце обнаружен искомый анализит) - нет (в образце не обнаружен искомый анализит)*», так и *количественно*, т.е. по содержанию анализита (по его количеству на единицу объема) в образце

При *качественном (альтернативном) учете* критерием оценки может быть интенсивность видимой реакции, для чего может использоваться система «4+» (см. табл. 6), и результат учитывается как *положительный* при интенсивности реакции не менее «2+». Оценочным критерием может быть также результат сопоставления зарегистрированного прибором показателя исследуемого образца с аналогичным показателем контрольного образца, который заведомо содержит исследуемый анализит в минимальной концентрации, еще определяемой используемым методом.

*Количественный учет* результатов реакции связан с оценкой содержания анализита в образце, которое может быть выражено какой-то величиной. При чем такой величиной может быть либо *титр анализита (максимальное разведение образца, при котором в нем еще обнаруживается анализит)*, либо любой конкретный

---

<sup>10</sup> Речь идет о таких изменениях реакционной среды в результате возникновения комплекса антиген-антитело, как ее помутнение, или изменение ее цвета, или интенсивности светового или радиоизлучения при использовании соответствующих «меток» реагентов.

цифровой показатель, отражающий содержание аналита и зарегистрированный использованным измерительным прибором.

Таблица 6.

Оценка результатов реакций агглютинации и преципитации  
по системе 4 «+» (по [53])

Показатели	Результат реакции			
	++++	+++	++	+ / -
Связывание антигена	полное, 100 %	~75 %	~50 %	менее 25 %
Образование белковых конгломератов	массивное, конгломераты не распадаются при встряхивании пробирок	массивное, конгломераты распадаются при встряхивании пробирок	умеренное, конгломераты распадаются при встряхивании пробирок	конгломераты отсутствуют
Состояние жидкой фракции системы	совершенно прозрачный супернатант	легкая опалесценция	выраженная опалесценция	мутная жидкость
Оценка результатов	реакция высоко-положительная	реакция умеренно положительная	реакция положительная	реакция сомнительная

Нужно отметить, что в публикациях, посвященных КЛД, и в нормативных документах, имеющих отношение к ней, первый вариант *количественного учета*, не слишком корректно именуется «*полуколичественным*». Поскольку в русском языке термин «полуколичество» не употребляется (ввиду его очевидной бессмысленности), не должно употребляться и соответствующее прилагательное, тем более что в статистике есть вполне корректные наименования для такого способа учета – «*порядковый*» или «*ранговый*». А поскольку *порядок* или *ранг* – это



вполне конкретная величина, т. е. количественная характеристика (положение объекта в каком-то множестве аналогичных объектов, расположенных в *порядке* увеличения или уменьшения какой-то общей для них характеристики, т.е. их *ранга*), *определение титра (порядка, ранга) разведения образца* вполне законно можно считать *количественным* способом учета результатов.

Кстати, именно *ранговой* является приведенная в табл. 6 система оценки интенсивности «4+». Более того, ранговым, по сути является и количественный учет содержания аналита в величинах, регистрируемых любым измерительным прибором, если только программное обеспечение таких приборов не включает перевод регистрируемых ими показателей в фактическое содержание аналита в единицах массы или в любых иных величинах, принятых для выражения количества аналита<sup>11</sup>, приведенных к единице объема реакционной среды.

Следует отметить и некорректность нередкого в медицинской литературе диагностического критерия – *диагностический титр*, т.е. *титр антител, определяемый на пике гуморального иммунного ответа путем многочисленных исследований на базах различных лабораторий и характерный для большинства случаев конкретного инфекционного заболевания* (см. напр. [25]). Такая величина, по нашему мнению, никак не может быть использована в качестве диагностического критерия, поскольку у разных пациентов динамика антителообразования неизбежно будет различна, а потому максимальный титр антител у них не только будет неизбежно различным, но и достигаться он будет в разное время, что по сути делает бесполезным для диагностики сопоставление фактического титра антител у конкретного пациента на момент исследования с неким усредненным *диагностическим титром*, независимо от числа исследований, на котором установлено значение последнего.

---

<sup>11</sup> Например, так называемые международные единицы (МЕ), которые, кстати, обычно являются титрами соответствующих аналитов, определенными в строго контролируемых условиях на базе специализированных лабораторий, уполномоченных на это соответствующими международными организациями.

Возвращаясь к соотношениям «регистрации» и «учета» результатов иммунохимических реакций, необходимо отметить, что развитие цифровых технологий привело к разработке приборов, программное обеспечение которых позволяет не только регистрировать характеристики проявлений реакции «антиген-антитело» *in vitro*, при необходимости одновременно переводя их в метрические показатели содержания аналита, но и выдавать готовую трактовку полученного результата.

В качестве примера можно привести аппаратно-программный комплекс (АПК) "Эксперт-Лаб-TORCH", разработанный специалистами Института биохимии им. А. Н. Баха РАН и ООО «ЭКОЛаб»<sup>12</sup>. Он состоит из стандартного сканерного модуля получения изображения и компьютера с программным обеспечением (рис. 71).



Рис. 71. Внешний вид аппаратно-программного комплекса «Эксперт-Лаб-TORCH»

Сканированное изображение объекта передается в компьютер и обрабатывается специальной программой. В окне программы наряду с первичным и схе-

---

<sup>12</sup> Патент на изобретение № 2013116455 RU. МПК G 01 N 33/53. Способ автоматизированной оценки и документирования результатов реакции микропреципитации для диагностики сифилиса/ Ю.Ю. Венгеров, А.Е. Туголуков, С.Г. Марданлы и др. – Заявл. 11.04.13

матическим изображением объекта при необходимости отражается калибровочная кривая, представляются результаты в интересующем формате. Результаты можно распечатать или сохранить в памяти компьютера.

При разработке соответствующих программ комплекс, в принципе, может быть использован для регистрации и учета результатов любых иммунохимических реакций, приводящих к каким-либо изменениям реакционной среды, которые могут быть отсканированы, т.е. представлены в цифровом варианте.

\*\*\*

### *Контрольные вопросы*

- 1. Что такое регистрация и учет результатов иммунодиагностических реакций?*
- 2. Способы учета результатов?*
- 3. Перспективы автоматизации регистрации и учета результатов иммунодиагностических реакций.*

## **2.4. Материальное обеспечение иммунохимических исследований в клинических лабораториях [21, 24, 31, 47]**

Хотя ряд иммунохимических тестов для своей постановки не нуждается в каком-то специальном оборудовании, а одной из очевидных тенденций совершенствования иммунодиагностических исследований является разработка тестов, сводящих до минимума необходимость такого оборудования вплоть до полного его отсутствия, все же для постановки большинства исследований, проводимых в настоящее время, необходимо соответствующее техническое оснащение. Более того, постоянное его усложнение, конечной целью которого является полная автоматизация процессов лабораторной диагностики, является другой, столь же очевидной тенденцией совершенствования КЛД.

Разумеется, конкретные требования к оснащению конкретной клинико-диагностической лаборатории должны, прежде всего, учитывать особенности тех медицинских организаций, которые обслуживаются этой лабораторией, в частности их профиль и мощности, а также конкретные запросы клиницистов.

Однако есть ряд требований, которые обязательны практически для любой лаборатории. В их числе - требования к лабораторным помещениям. Самым общим из них можно считать то, что лабораторный корпус, все рабочие помещения и их оборудование должны обеспечивать возможность безопасного проведения заданной номенклатуры диагностических исследований в необходимом объеме. Обязательна организация водоподготовки и технического обслуживания оборудования, обязательно соответствие уровня профессиональной подготовки персонала уровню сложности выполняемых исследований, в связи с чем обязательна организация обучения персонала, обязательна организация внутрилабораторного и внешнего контроля качества проводимых исследований и, наконец, обязательно обеспечение необходимой технологической и инструктивно-методической документацией по всем аспектам деятельности лаборатории и всем видам проводимых исследований. Более детально эти требования рассмотрены в разделе 2.5.1 следующей главы.

Если же в лаборатории предполагается проведение исследований вредных и/или опасных веществ, например, патогенных микроорганизмов, помещения, оборудование и подготовка персонала, должны, кроме общих требований, соответствовать специальным требованиям действующих санитарно-эпидемиологических норм и правил работы в таких условиях<sup>13</sup>.

Конкретизацией перечня оборудования, минимально необходимого для реализации наиболее востребованных *иммунодиагностических реакций*, можно считать Приложение № 9 к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 16 марта 2010 г. N 151н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным дерматовенерологического профиля и больным лепрой". Хотя этот приказ уже утратил свою силу, приведенный в приложении к нему перечень оборудования с добавкой ряда позиций, рекомендуемых Литвиновой З.А. и Землянской Н.А. [24] (см. табл. 7), вполне можно ориентиром при организации работы лаборатории, который к тому же всегда может быть уточнен, поскольку в инструкциях по применению конкретных наборов реагентов всегда приводятся перечни оборудования, необходимого для проведения исследований с использованием этих наборов.

Некоторые позиции из этого перечня показаны на рис. 72-82.

Таблица 7.

Рекомендуемое оснащение КДЛ для проведения иммунохимических исследований

№ пп.	Наименование
<i>Основное оборудование</i>	
1.	Прибор для чтения результатов ИФА (ридер для ИФА)
2.	Устройство для ИФА промывающее автоматическое (вошер)
3.	Магнитные мешалки, орбитальный шейкер
4.	Инактиватор сыворотки крови

<sup>13</sup> Санитарные правила и нормы СанПин 3.3686-21. "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней". Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 4.

5.	Микроскоп стандартный лабораторный
6.	Микроскоп для проведения исследований методом иммунофлуоресценции (реакция иммунофлуоресценции)
7.	Термостат суховоздушный
8.	Центрифуга лабораторная
9.	Автоматический анализатор для проведения исследований методом ИФА*
10.	Автоматический анализатор для проведения исследований методом хемилюминесценции
11.	Проточный цитофлуориметр
12.	Автоматический анализатор для проведения исследований методом иммуноблоттинга
13.	Автоматический анализатор для проведения исследований методом хМАР
14.	Прибор для печати биомикрочипов (иммуночипов)*
15.	Прибор для чтения результатов исследования на биомикрочипах (иммуночипах)
16.	Ламинарный шкаф
17.	Фотоэлектроколориметр (ФЭК)
<i>Вспомогательное оборудование</i>	
18.	Набор пипеточных дозаторов одноканальных
19.	Набор пипеточных дозаторов восьмиканальных
20.	Бытовые холодильники
21.	Облучатели бактерицидные настенные
22.	Спиртовки
23.	Стеклянная посуда (пробирки, чашки Петри, пипетки, серологические планшеты, центрифужные пробирки)
<i>Мебель</i>	
24.	Лабораторная мебель
ИКТ-оборудование (информационно-коммуникационное технологическое оборудование)	

25.	Компьютеры, сетевое оборудование, мультимедийные устройства и прочие устройства и программы, необходимые для получения и хранения информации
<i>Документация</i>	
26	Технологические инструкции (инструкции по эксплуатации оборудования, инструкции по применению наборов реагентов), инструкции по правилам работы в лаборатории (в частности, инструкции по пожарной безопасности, инструкции по охране труда и технике безопасности)



Рис. 72. Центрифуги лабораторные



Рис. 73. Лабораторные дозаторы



Рис. 74. Спектрофотометры





Рис. 75 Магнитные мешалки



Рис. 76. Весы лабораторные



Рис. 77. Иммунохимический анализатор АББОТТ Architect i2000SR



Рис. 78. Люминесцентный микроскоп МИКМЕД-2



Рис. 79. Микроскопы



Рис. 80. Насос перистальтический

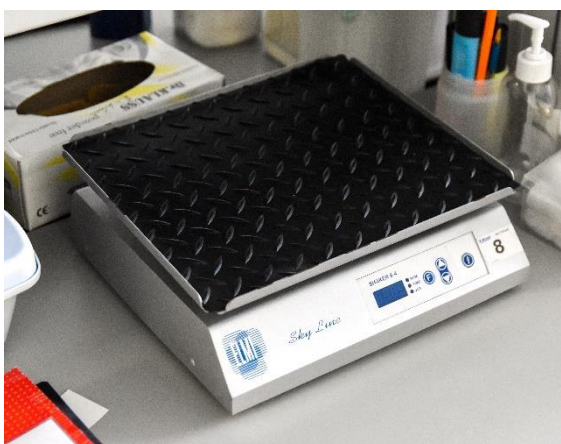


Рис. 81. Шейкеры



Рис. 82. Ламинарный бокс

\*\*\*

*Контрольные вопросы*

*1. Что входит в перечень обязательного оборудования клинично-диагностических лабораторий, проводящих иммунохимические исследования?*

## **2.5. Особенности промышленного производства наборов реагентов для иммунохимических исследований в клинических лабораториях**

[1, 2, 4, 12, 13, 14, 30, 40, 32, 33, 36, 43, 44, 48, 55]

Работа современных клиничко-диагностических лабораторий немислима без использования готовых наборов реагентов, позволяющих реализовать все необходимые методики диагностических исследований *in vitro*. Промышленное производство таких наборов давно уже стало самостоятельной отраслью любого сколь-либо экономически развитого государства. Не является исключением и Российская Федерация. И хотя в конце прошлого века эта отрасль по ряду причин едва не пришла в полный упадок, а на Российском рынке средств диагностики *in vitro* было откровенное засилье импорта, к настоящему времени ситуация изменена кардинально, в том числе и за счет курса на импортозамещение во всех отраслях отечественной промышленности. Однако один аспект промышленного производства средств лабораторной диагностики в России, именуемых сейчас медицинскими изделиями для *in vitro*-диагностики (МИ<sub>ивд</sub>), и, в частности, наборов реагентов для иммунодиагностики, еще не нашел адекватного решения.

Как и любое иное промышленное производство, производство этой продукции невозможно без наличия детально разработанных технологий, т.е. без конкретной документально зафиксированной последовательности операций преобразования исходного сырья и материалов в конечный продукт производства с использованием конкретных методических приемов и оборудования.

К сожалению, в отличие от производства лекарственных средств, в доступной литературе сегодня не найти ни соответствующих нормативно-методических документов и руководств, ни тем более учебников по производству МИ<sub>ивд</sub>, так что в разработке технологии производства любого нового МИ<sub>ивд</sub> можно ориентироваться только на самые общие принципы организации промышленного производства вообще. В последние годы этот пробел частично ликвидирован монографией С.Г. Марданлы с соавт. «Производство наборов реагентов для клинической

лабораторной диагностики иммунохимическими методами» [28], и учебным пособием «Серологическая диагностика манифестных форм острых кишечных инфекций: правила производства сывороток диагностических» [34] (составители С.Г. Марданлы с соавт.); материалы этих изданий использованы в настоящей главе.

## **2.5.1. Организация производства**

### ***2.5.1.1. Общие требования***

Требования к организации производства однотипны для любых производств продукции медицинского назначения и, как в любых производствах, правильная его организация и, в частности, правильная подготовка, по сути, определяют результат любой попытки наладить производство и выпуск даже простейших наборов реагентов.

Поэтому, хотя для медицинских изделий вообще и МИ<sub>ивд</sub>, в частности, до сих пор нет утвержденных нормативных документов (соответствующего Закона РФ и Технического регламента), определяющих в том числе порядок и правила подготовки их производства, особых затруднений при планировании и реализации всех необходимых организационно-технических мероприятий, как правило, не возникает.

Техническая подготовка производства складывается из *проектно-конструкторской подготовки, технологической подготовки, организационно-экономической подготовки и промышленного освоения новой продукции.*

*Проектно-конструкторская подготовка* – это разработка новой и совершенствование уже производимой продукции, что может быть связано также с разработкой проекта реконструкции и переоборудования всего предприятия или отдельных его подразделений. В ходе этой подготовки решаются, кроме всего, вопросы оптимального размещения производства на имеющихся у предприятия площадях. В качестве примера можно привести поэтажные схемы размещения производства иммунохимических МИ<sub>ивд</sub> на предприятии "ЭКОлаб" (рис. 83, 84).

*Технологическая подготовка* представляет собой разработку и освоение всей совокупности новых технологических процессов.

*Организационно-экономическая подготовка* – это комплекс мероприятий по обеспечению процесса производства новой или усовершенствованной продукции всем необходимым.

*Промышленное освоение новой продукции* – это процесс, который начинается с изготовления ее опытного образца и завершается ее серийным производством

Применительно к производству МИ<sub>ивд</sub> необходимым элементом проектно-конструкторской и технологической составляющих подготовки производства является разработка, согласование и утверждение комплекта технической документации, который в соответствии с ГОСТ Р 1.4-2004 «Стандарты организаций. Общие положения» представляет совокупность документов, необходимую и достаточную для использования на каждой стадии жизненного цикла продукции, а также для обязательной государственной регистрации каждого нового для Российского рынка МИ<sub>ивд</sub> или перерегистрации усовершенствованного продукта в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 27 декабря 2012 г. N 1416 "Об утверждении правил государственной регистрации медицинских изделий".

### ***2.5.1.2. Техническая документация***

В комплект технической документации на МИ<sub>ивд</sub> входят, прежде всего, технические условия на продукт (ТУ), инструкция по его применению (ИП) и регламент его производства (РП).

#### ***2.5.1.2.1. Технические условия***

Общие правила построения, изложения, оформления, согласования и утверждения ТУ определены ГОСТ 2.114-2016 «Межгосударственный стандарт. Единая система конструкторской документации. Технические условия», а особенности ТУ на МИ<sub>ивд</sub> – ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагно-

стики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации».

Хотя ГОСТы на сегодня – это только рекомендательные документы, но государственные и негосударственные организации и учреждения, задействованные в процедуре допуска новой продукции к обращению на отечественном рынке, нередко требуют соблюдения рекомендаций ГОСТов, и поэтому знание их существенно облегчает прохождение указанной процедуры.

В соответствии с названными выше ГОСТами ТУ – это часть технической документации на изделие, представляющая стандарт предприятия, в котором указываются название и назначение продукта, требования к его составу, безопасности и охране окружающей среды, показателям качества, упаковке и маркировке, порядку приемки, методам контроля качества, условиям транспортирования и хранения до использования по назначению, указания по эксплуатации и гарантии поставщика.



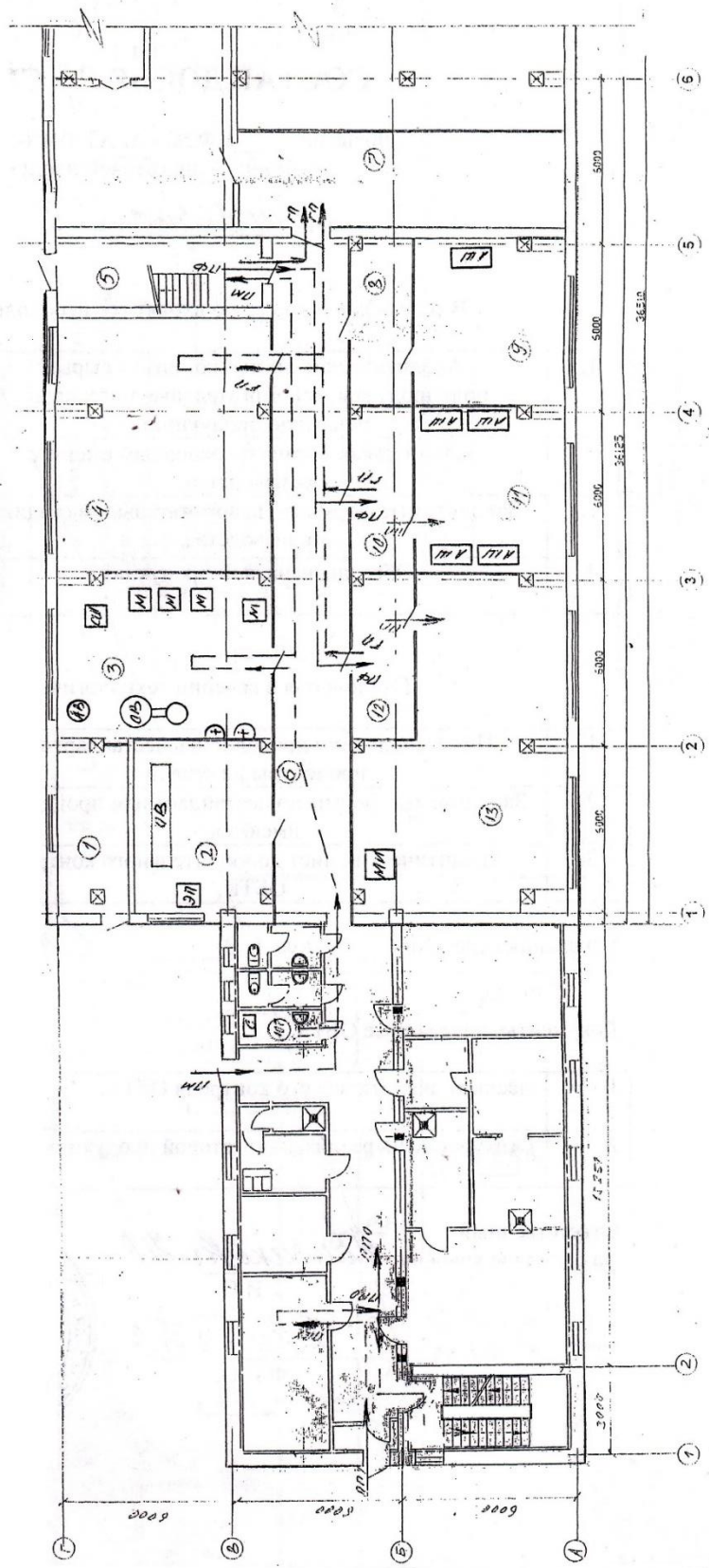


Рис. 83. Расположение помещений 1 этажа производства иммунохимических МИИвд в ООО "ЭКОлаб"

ЭКСПЛИКАЦИЯ ПОМЕЩЕНИЙ

№ ПОМ.	НАИМЕНОВАНИЕ ПОМЕЩЕНИЯ	ПЛОЩАДЬ, м <sup>2</sup>
1	Тепловой пункт	16,6
2	Водоподготовка	33,9
3	Мылка фазонов и стерилизация	45,9
4	Участок комплектовки и фасовки	69,5
5	Лестница	18,2
6	Коридор	67,0
7	Холодильная камера цеха	26,8
8	Тамбур бокса 9	13,5
9	Бокс розлива буферов	32,0
10	Тамбур бокса 11	13,5
11	Бокс розлива К+К- конъюнктов	32,0
12	Тамбур бокса 13	13,5
13	Бокс сортировки и п/офизикации планшетов	84,4
107	Помещение приемки сыворотки	3,4

ЭКСПЛИКАЦИЯ ОБОРУДОВАНИЯ

№ ПОМ.	НАИМЕНОВАНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ	Обознач.	КОЛ-ВО
2	Установка для получения очищенной воды	ОВ	1
	Электрощитовая	ЭЛ	1
3	Установка для получения очищенной воды	ОВ	1
	Автоклав	АВ	1
	Морозильник	М	4
9	Сухожаровой шкаф	СШ	1
	Ламинарный шкаф	ЛШ	1
11	Ламинарный шкаф	ЛШ	4
13	Микробиологический инкубатор	МИ	1
107	Стол	С	1

- П/У - Персонал в рабочей одежде
- П/В - Персонал в переходной одежде
- П/Ч - Персонал в чистой одежде
- П/М - Производственный материал (Сырье сыворотки, вирусов и микр.)
- П/П - Полуфабрикат
- П/Г - Готовый продукт

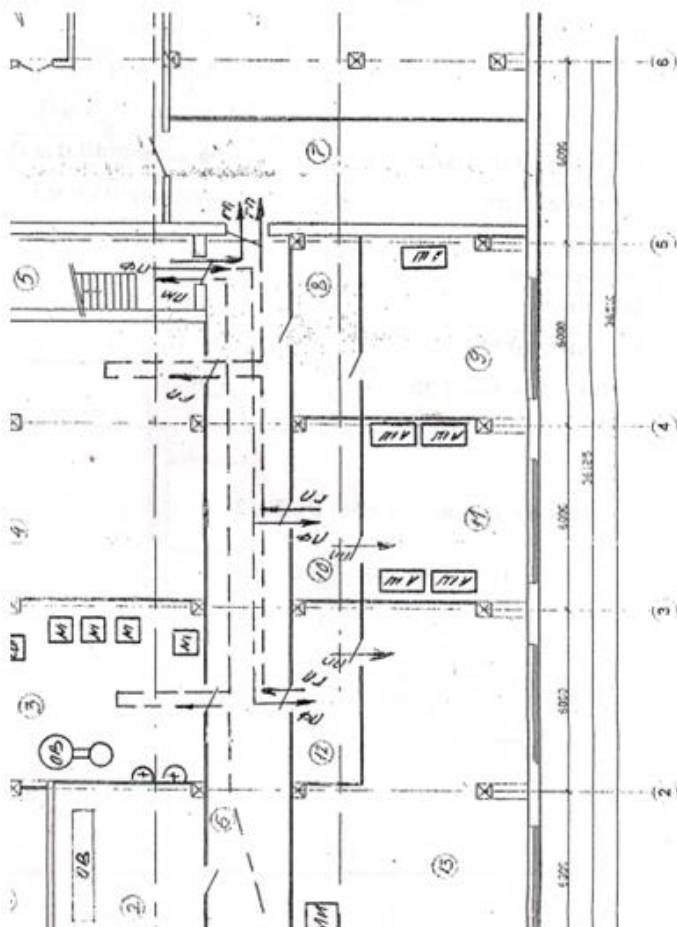


Рис. 83 (продолжение). Расположение и экспликация помещений 1 этажа производства иммунохимических МИ<sub>ИВД</sub> в ООО "ЭКОлаб"

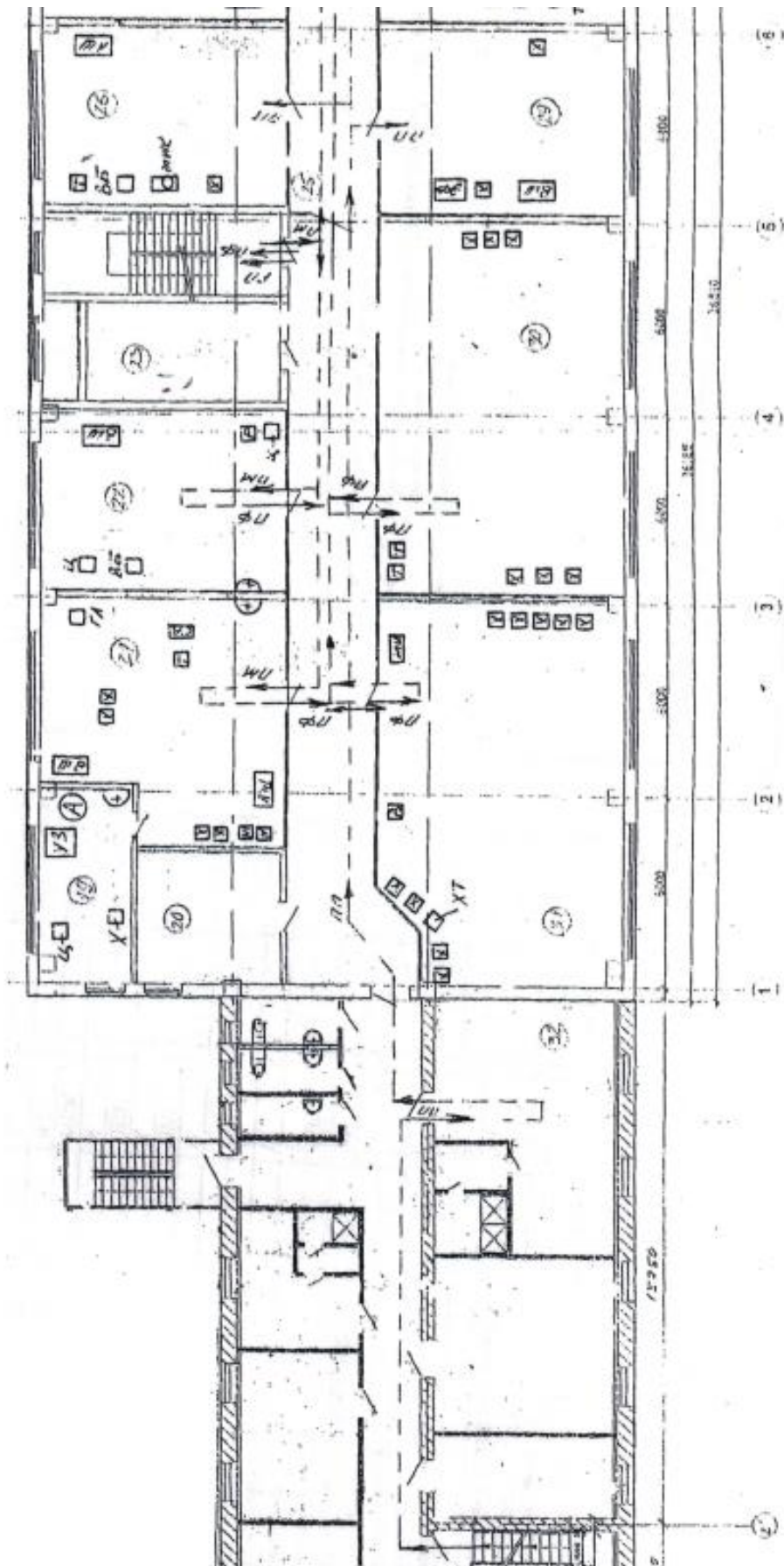


Рис. 84. Расположение помещений 2 этажа производства иммунохимических МИ<sub>ИВД</sub> в ООО "ЭКОлаб"



ЭКСПЛИКАЦИЯ ПОМЕЩЕНИЙ

№ ПОМ.	НАИМЕНОВАНИЕ ПОМЕЩЕНИЯ	ПЛОЩАДЬ, м <sup>2</sup>	ПРИМЕЧ.
19	Лаборатория белковой инженерии	18,6	
20	Экстракционная	18,0	
21	Лаборатория белковой инженерии	58,0	
22	Центрифужная	45,0	
23	Венткамера	18,6	
24	Лестница		
25	Тамбур боксов	31,1	
26	Бокс культур клеточ	44,4	
27	Бокс ПЦР	42,1	
28	Бокс культур вирусов	42,1	
29	Лаборатория производства БЛОТ-ВНЧ-1	44,4	
30	Лаборатория ИФА	91,8	
31	Лаборатория ИФА	94,8	
32	Гардеробная	39,5	

- ← П/П - Персонал в переходной одежде
- ← П/Ч - Персонал в чистой одежде
- ← П/Ф - Производственный материал (Сырье сыеротки, вирусов и микроорганизмов)
- ← П/Р - Полуфабрикат
- ← П/Г - Готовый продукт

ЭКСПЛИКАЦИЯ ОБОРУДОВАНИЯ

№ ПОМ.	НАИМЕНОВАНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ	Обознач.	КОЛ-ВО	ПРИМЕЧ.
19	Центрифуга	Ц	1	
	Ультразвуковая установка	УЗ	1	
	Автоклав	АВ	1	
	Холодильник	Х	1	
21	Холодильник	Х	4	
	Морозильник	М	2	
	Термостат	Т	1	
	Ламинарный шкаф	ЛШ	1	
	Вытяжной шкаф	ВШ	1	
	Стерилизатор воздуха	СВ	1	
22	Центрифуга	Ц	2	
	Ридер	Р	1	
	Водяная баня	ВД	1	
	Вытяжной шкаф	ВШ	1	
26	Термостат	Т	1	
	Водяная баня	ВД	1	
	Микроскоп	МИК	1	
	Холодильник	Х	1	
	Ламинарный шкаф	ЛШ	1	
27	Холодильник	Х	2	
	Ламинарный шкаф	ЛШ	3	
	Автоклав	А	1	
28	Холодильник	Х	2	
	Термостат	Т	1	
	Сосуд Дьюара	Д	1	
	Центрифуга	Ц	1	
29	Оборудование для электрофореза	ЭФ	1	
	Холодильник	Х	2	
	Вытяжной шкаф	ВШ	1	
30	Термостат	Т	2	
	Холодильник	Х	4	
31	Вошер	В	1	
	Микробиологический инкубатор	МИ	1	
	Холодильник	Х	9	
	Хладотермостат	ХТ	1	

Рис. 84. (продолжение). Экспликация помещений 2 этажа производства иммунохимических МИ<sub>ИВД</sub> в ООО "ЭКОлаб"

ТУ на МИ<sub>ивд</sub>, как правило, состоят из вводной части и следующих разделов:

- Технические требования.
- Требования безопасности и охраны окружающей среды.
- Правила приемки.
- Методы контроля.
- Транспортирование и хранение.
- Указания по эксплуатации.
- Гарантии изготовителя.

*Вводная часть* содержит полное и сокращенное (торговое) наименование набора реагентов, его назначение, перечень реагентов, входящих в состав набора, варианты комплектов поставки набора (при их наличии) с указанием числа определений, на которые рассчитан каждый вариант, область применения набора (при необходимости) и условия эксплуатации.

Мы рекомендуем такую редакцию этой части:

*«Настоящие технические условия распространяются на набор реагентов ...дается полное и сокращенное наименование..., далее по тексту – набор, предназначенный для ... формулировка назначения набора с указанием исследуемых материалов и метода исследования...»*

*Набор выпускается в следующих комплектах ... дается перечень всех комплектов если набор выпускается в нескольких комплектах ...»*

*В состав набора входят следующие реагенты: ...дается перечень всех реагентов набора (их аббревиатуры и/или полные названия, если набор выпускается в нескольких комплектах, даются перечни реагентов каждого комплекта отдельно...»*

*Базовая комплектация набора рассчитана на исследование ...число... образцов, включая контрольные,...при возможности дробного использования набора указывается такая возможность; если набор выпускается в нескольких комплектах, число исследуемых образцов указывается для каждого комплекта*

*Область применения – клиническая лабораторная диагностика.*

Пример обозначения набора при его заказе и в документации другого изделия: Набор ...дается краткое (торговое) наименование..., по ТУ ... дается номер ТУ..., код ОКП ... дается код Общероссийского классификатора продукции...»

В разделе 1. "Технические требования" в качестве его подразделов приводятся:

а) Перечень документации, которой должен соответствовать и по которой должен производиться набор (обычно это ссылка на сами ТУ и РП).

Рекомендуемая редакция:

«1.1. Набор должен соответствовать требованиям настоящих технических условий и изготавливаться по промышленному регламенту ... номер РП..., утвержденному в установленном порядке.»

б) Перечень показателей качества продукта, их характеристики и нормы со ссылкой на метод определения из раздела 4 (дается обычно в виде таблицы).

Рекомендуемая редакция:

«1.2. По показателям качества набор должен соответствовать требованиям и нормам, указанным в табл. 1.

Таблица 1.

№ п/п	Наименование показателя	Характеристика и нормы	Методы контроля
1	2	3	4
			<i>Пункт раздела 4 ТУ</i>

в) Комплектность, т.е. перечень всех компонентов, входящих в состав комплекта поставки, и состав набора реагентов – описание каждого реагента с указанием спецификации каждой составной части, количества (объема или массы) реагента в индивидуальной упаковке и числа индивидуальных упаковок, входящих в комплект; при выпуске набора в нескольких комплектах характеризуется комплектность каждого из них.

Рекомендуемая редакция:

### «1.3. Комплектность

1.3.1. В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению.

#### 1.3.2. Состав набора:

*...Для каждого реагента дается его аббревиатура и полное наименование, указанное во вводной части, что собой представляет реагент с указанием спецификации (документа с набором требований, которым должен соответствовать реагент, это может быть ТУ на него, ГОСТ или каталожный № производителя), квалификации (характеристики химической чистоты, если реагент однокомпонентный и имеет градации чистоты), фирмы-производителя и ее государственной принадлежности, состава (если реагент не однокомпонентный, указываются все его компоненты с перечисленными выше характеристиками каждого компонента и его процентным содержанием в реагенте), количества реагента в наборе (масса или объем в индивидуальной упаковке и число индивидуальных упаковок; если набор выпускается в нескольких комплектах, количество реагента указывается отдельно для каждого комплекта)...*

1.3.3. Допускается использование реагентов (их составляющих) производства других фирм при условии сохранения основных характеристик набора, определяющих возможность его использования по целевому назначению.

1.3.4. По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

1.3.5. Дополнительно в комплект поставки могут входить:...*это если предусмотрены такие дополнительные компоненты, например, для иммуноферментных тест-систем это могут быть*

- пластиковые емкости - 4 шт.;

- одноразовые наконечники для автоматических пипеток на 200 мкл - 16 шт.;

- клейкая пленка для заклеивания планшетов - 4 шт.»



г) Требования к индивидуальной упаковке каждого реагента, групповой упаковке единицы комплектации набора и транспортировочной таре.

Рекомендуемая редакция:

#### «1.4. Упаковка

1.4.1. ...*Для каждого реагента отдельно – дается наименование или аббревиатура реагента...должен быть упакован ...если необходимо, указать на герметичность упаковки...(расфасован ...если это жидкий или сыпучий реагент) в ...указывается конкретная форма упаковочного материала, ее торговое наименование или его аббревиатура, если они есть, вместимость используемой емкости, ее спецификация, фирма-производитель, если укупоривается, то чем – наименование материала укупорки, его спецификация, фирма-производитель...».*

1.4.2..... *При наличии дополнительной комплектации набора указывается упаковка каждого дополнительного компонента...*

1.4.3.... Пакеты и флаконы с компонентами набора, инструкция по применению должны быть упакованы в пачку из картона коробочного (ГОСТ 7933), или картона хром-эрзац (ТУ 13-7309005-660-87), или картона гофрированного (ГОСТ 7376). Пачка должна быть заклеена лентой бумажной (ГОСТ 18510), или лентой клеевой на бумажной основе (ГОСТ 18251), или лентой полиэтиленовой с липким слоем (ГОСТ 20477) таким образом, чтобы пачка не могла быть вскрыта без нарушения целостности упаковки.

1.4.4..... Пачки с наборами должны быть упакованы в ящики из картона гофрированного (ГОСТ 7933). В каждый ящик вкладывается бланк потребителя с пояснительным уведомлением (стандартный бланк, заполняемый потребителем при наличии претензий или пожеланий к качеству набора) – ... *указывается число пачек в ящике...штук.*

1.4.5..... Допускается использование упаковочных материалов (флаконы, пакеты, бумага, картон) других фирм и (или) иной спецификации, обеспечивающих сохранность реагентов и набора в целом в условиях хранения и транспортирования, указанных в настоящих ТУ.»

д) Требования к маркировке индивидуальной, групповой и транспортной тары.

Рекомендуемая редакция:

#### 1.5. Маркировка

1.5.1. Маркировка выполняется по рекомендациям ГОСТ Р51088.

1.5.2. На каждый пакет (кроме пакета со вспомогательными емкостями и наконечниками) и флакон должна быть наклеена этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625) или бумаги писчей (ГОСТ 18510) с указанием: *...приводятся позиции, рекомендованные ГОСТ 51088, допускается дополнять их позициями и указаниями, необходимость в которых определяется особенностями набора...*

1.5.3. На каждую пачку должна быть наклеена этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625) или бумаги писчей (ГОСТ 18510) с указанием: *...приводятся позиции, рекомендованные ГОСТ 51088, допускается дополнять их позициями и указаниями, необходимость в которых определяется особенностями набора...*

Допускается нанесение текста этикетки непосредственно на пачку.

1.5.4. На каждый ящик должна быть наклеена этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625) или бумаги писчей (ГОСТ 18510) с указанием: *...приводятся позиции, рекомендованные ГОСТ 51088, допускается дополнять их позициями и указаниями, необходимость в которых определяется особенностями набора...*

Допускается нанесение текста этикетки непосредственно на ящик

1.5.5. На каждый ящик должны быть, согласно ГОСТ 14192, нанесены манипуляционные знаки "Биопрепараты" "Хрупкое Осторожно", "Верх", "Беречь от влаги", "Ограничение температуры".

В разделе 2 «Требования безопасности и охраны окружающей среды» указывают класс опасности – потенциальный риск неблагоприятных последствий применения набора по назначению и меры предосторожности при работе с ним. Определение класса опасности выполняют с учетом требований приказа МЗ РФ № 4н от 06.06.2012 г. "Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий").

Рекомендуемая редакция:

2.1. Потенциальный риск применения набора – класс ...указывается класс... (Приказ МЗиСР РФ № 4н от 06.06.2012 г.).

2.2. ...Указывается токсичность компонентов набора, при ее наличии и меры, которые необходимо предпринимать для предупреждения попадания токсичных компонентов на кожу и слизистые и при попадании...

2.3. Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение «Правил по охране труда в медицинских организациях», утвержденных приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 18.12.2020 г. N 928н.

В разделе 3 "Правила приемки" излагается порядок контроля продукции, органами технического контроля предприятия-изготовителя, оговариваются правила и условия приемки, порядок и условия забракования продукции и возобновления приемки (повторного контроля) после анализа выявленных дефектов и их устранения, а также условия и порядок окончательного забракования продукции.

Рекомендуемая редакция:

«3.1. Каждая серия набора должна быть принята отделом биолого-технического контроля (ОБТК) предприятия-изготовителя. Серией считается все количество наборов, произведенных в одном технологическом цикле (от входного контроля сырья до упаковки и маркировки готовой продукции включительно).

Серия набора предъявляется для приемки ОБТК по завершении технологического цикла ее производства.

3.2. ОБТК предприятия-изготовителя контролирует качество упаковки, маркировки, комплектность поставки, а также соответствие показателей качества набора требованиям настоящих технических условий.

3.3. Для контроля качества набора и создания музея набора ОБТК методом случайного отбора составляет из каждой серии набора выборку из 3 образцов набора.

3.4. После проверки качества упаковки, маркировки и комплектности поставки 1 образец набора используют для контроля на соответствие требованиям

технических условий. При положительных результатах первичного контроля ОБТК отбирает образцы набора для создания музея ОБТК в количестве, необходимом для полного контроля. Музейные образцы хранят в музее до истечения срока годности.

3.5. При неудовлетворительных результатах контроля хотя бы по одному из показателей проводят повторный контроль еще 2 образцов набора из той же серии по всем показателям качества. Результаты повторного контроля распространяют на всю серию. При неудовлетворительных результатах повторного контроля серию бракуют. Возможность переработки брака определяется его характером.

3.6. При положительных результатах контроля серии ОБТК оформляет на нее паспорт, в котором должны быть указаны:

- наименование предприятия-изготовителя;
- полное и торговое название набора;
- дата изготовления (месяц, год);
- номер серии набора;
- номер и дата выдачи паспорта;
- результаты контроля по всем показателям и заключение по ним;
- срок годности (месяц, год);
- условия хранения;
- номер настоящих технических условий;
- номер регистрационного удостоверения и дата регистрации,
- штамп ОБТК и подпись ответственного лица.

На паспорте должна стоять печать ОБТК и подпись ответственного лица.

3.7. Паспорт на серию должен входить в комплект сопроводительной документации на продукцию. Число экземпляров паспорта каждой серии, входящих в комплект сопроводительной документации, должно быть определено в договоре на поставку продукции.

3.8. Контроль качества набора при изготовлении осуществляет ОБТК предприятия-изготовителя. Государственный контроль качества выпускаемого набора

проводит учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение указанного контроля. На государственный контроль ОБТК предприятия-изготовителя отсылает необходимое для полного контроля количество образцов набора каждой серии в соответствии с требованиями контролирующей организации.»

В разделе 4 "*Методы контроля*" излагаются методики контроля показателей качества, указанных в разделе 1. Для каждого метода контроля должны быть указаны необходимое оборудование, материалы и реактивы, описаны подготовка к контролю, его проведение, обработка и оценка полученных результатов.

В разделе 5 "*Транспортирование и хранение*" устанавливают требования к условиям транспортирования до потребителя и хранения у потребителя вплоть до использования по назначению, обеспечивающие сохранение качества продукта в течение гарантированного срока годности.

Рекомендуемая редакция:

«5.1. Транспортирование при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

5.2. Хранение - в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.»

*Указаны чаще всего используемые условия транспортирования и хранения; при иных заданных условиях – заменить ими приведенные*

В разделе 6 "*Указания по эксплуатации*" приводят указания по правилам применения продукта в соответствии с его назначением.

Рекомендуемая редакция:

«6.1. Набор должен применяться согласно инструкции по применению, утвержденной в установленном порядке.»

В разделе 7 "*Гарантии изготовителя*" указывается срок годности продукта, гарантируемый производителем при соблюдении оговоренных выше правил его транспортирования, хранения и использования.

Рекомендуемая редакция:

7.1. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящими техническими условиями и инструкцией по применению.

7.2. Срок годности набора – ...указывается срок... со дня приемки ОБТК предприятия-изготовителя.

ТУ утверждаются руководителем предприятия, на котором они разработаны, может потребоваться их согласование с руководителем организации, которая будет проводить технические приемочные испытания МИ<sub>ивд</sub> и экспертиза в одной из организаций, уполномоченных Росздравнадзором на проведение таких экспертиз.

ТУ на МИ<sub>ивд</sub> утверждают, как правило, без ограничения срока действия.

#### 2.5.1.2.2. Инструкция по применению

ИП является эксплуатационным документом для МИ<sub>ивд</sub>, рекомендации по составлению которого изложены в ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации».

ИП должна четко идентифицировать изделие, определять его назначение, включать всю информацию, необходимую для правильного и безопасного применения изделия. Исходя из этого она должна содержать следующие сведения:

- наименование изделия;
- состав изделия;
- назначение изделия;
- метод исследования;
- специфические аналитические функциональные характеристики [чувствительность, специфичность, точность (правильность и прецизионность)], границы обнаружения и диапазон измерения, включая контроль потенциальной интерференции;

- ограничения метода, информацию по использованию доступных методик измерения и материалов потребителем;

- условия и срок хранения после первого вскрытия внутренней упаковки, а также условия хранения и стабильность рабочих реагентов;

- указание о прекращении применения серии изделия по истечению срока ее годности;

- правила представления рекламаций;

- указания о необходимости использования специального оборудования, включая необходимую информацию для его идентификации;

- тип исследуемых образцов биологического материала, условия их сбора, взятия, предварительной обработки и, при необходимости, условия хранения, а также меры предосторожности при обращении с материалом исследования;

- подробное описание процедур, которых следует придерживаться при использовании изделия;

- детали процедур, которые следует производить до использования изделия (например, растворение, инкубация, разбавление, проверка инструмента и т.п.);

- указание на проведение обучения персонала (при необходимости);

- математический подход, используемый для расчета результатов анализа (при необходимости);

- меры, предпринимаемые в случае изменения аналитических характеристик изделия;

- информацию для пользователей по внутреннему контролю качества, включая специфичные процедуры валидации и проверки калибровки изделия;

- референтные интервалы для определяемого значения величины;

- дату утверждения или последнего пересмотра инструкции.

В соответствии с этим рекомендуется следующая структура ИП по разделам:

- Назначение.

- Характеристика изделия.
- Аналитические характеристики изделия.
- Меры предосторожности при работе с изделием.
- Оборудование и материалы, необходимые при работе с изделием.
- Анализируемые пробы/объекты (при необходимости).
- Подготовка компонентов/изделия для исследования (при необходимости).
- Проведение исследования (анализа).
- Расчеты (при необходимости).
- Условия хранения, транспортирования и эксплуатации изделия.

В разделе «Назначение» указываются полное и краткое (торговое) наименование изделия, предназначение изделия и его диагностическая роль.

В разделе «Характеристика изделия» должны быть указаны состав изделия, число анализируемых проб биологического материала, принцип метода, положенного в основу работы изделия.

В разделе «Аналитические характеристики изделия» должны быть указаны все соответствующие характеристики, приведенные в ТУ.

В разделе «Меры предосторожности при работе с изделием» должны быть указаны меры безопасности, позволяющие предохранять оператора от возможного вредного влияния компонентов изделия на организм.

В разделе «Оборудование и материалы, необходимые при работе с изделием», должно быть указано все необходимое оборудование (включая измерительное, дозирующее, лабораторную посуду), а также материалы и реагенты, не входящие в состав изделия, но необходимые для проведения исследования.

В разделе «Анализируемые пробы» необходимо указывать вид анализируемого биологического материала, процедуру получения анализируемого биологического материала (при необходимости), ограничения по использованию анализируемого материала, условия возможного хранения анализируемых образцов биологического материала.



В разделе «Подготовка компонентов для исследования (анализа)» должны быть указаны методы приготовления реагентов (при необходимости) и подготовки других компонентов набора (при необходимости).

В разделе «Проведение исследования (анализа)» необходимо указывать расход каждого компонента (реагента), последовательность проведения этапов исследования (анализа), необходимые дополнительные процедуры (промывка, инкубирование, встряхивание и т. п.), процедуры регистрации и учета результата.

В разделе «Расчеты» должны быть указаны способы построения калибровочной кривой (при необходимости) или формулы расчета содержания аналита, используемые компьютерные программы (при необходимости).

В разделе «Условия хранения, транспортирования и эксплуатации изделия» должны быть указаны условия хранения и транспортирования изделия, срок его годности, срок годности вскрытых компонентов изделия, срок годности приготовленных для работы компонентов (реагентов).

Для конкретных МИ<sub>ивд</sub> структура ИП и содержание отдельных разделов могут отличаться от рекомендованных.

Все характеристики МИ<sub>ивд</sub>, приводимые в ИП, должны полностью совпадать с аналогичными характеристиками, указанными в ТУ.

ИП утверждается руководителем предприятия, производящего его.

#### *2.5.1.2.3. Технологическая документация*

В подготовке производства особое внимание необходимо уделить подготовке комплекта технологической документации, определяющей порядок и правила выполнения и регистрации результатов всех без исключения вспомогательных и основных технологических стадий и операций. Применительно к производству МИ<sub>ивд</sub> речь идет о производственном регламенте (ПР) и технологических инструкциях (сейчас они именуются "Стандартными операционными процедурами" – СОП).

Поскольку нормативных документов федерального и отраслевого уровней, регламентирующих правила построения и оформления ПР и СОП еще не существует, предприятие-изготовитель МИ<sub>ивд</sub> должно располагать собственными стандартами выполнения этих работ.

В соответствии с назначением ПР и СОП основным требованием к этим документам является, по нашему мнению, полнота и точность описания всех элементов технологического процесса. К сожалению, это требование не всегда учитывается специалистами, ответственными за подготовку технологической документации. Причина, как ни странно, чаще всего, в том, что указанные специалисты очень хорошо знают описываемую технологию и создают документы, рассчитанные на персонал, столь же хорошо знакомый с процессом, опуская при этом многие элементы его описания, как само собой разумеющиеся. И, хотя сами они вполне могут обходиться такими неполными инструкциями, последние не могут служить достаточно надежным основанием ни для любого контроля правильности ведения технологического процесса, ни для подготовки персонала (техническая учеба нового персонала, инструктажи по технике безопасности, зачеты) что также входит в число обязательных составляющих подготовки производства.

Форма ПР, по нашему мнению, может быть различной. Регламент, так же, как регламенты производства лекарственных средств, может быть представлен единым документом, в котором изложены все необходимые и достаточные для производства серийной продукции сведения, но может также быть всего лишь указателем отдельных СОП и других стандартов предприятия, в совокупности содержащих тот же объем информации, что и единый ПР. Необходимо только подчеркнуть, что комплект этих отдельных документов должен действительно охватывать весь процесс производства МИ<sub>ивд</sub>, все его стороны, включая подготовку и правила эксплуатации оборудования, необходимого для выполнения всех технологических операций, и подготовку помещений, в которых эти операции будут выполняться, вопросы охраны труда работающего персонала и окружаю-

щей среды. Стоит особо отметить, что для большей части продукции медицинского назначения и, в том числе для МИ<sub>ивд</sub>, одним из наиболее важных элементов подготовки производства является водоподготовка, поскольку от качества воды, используемой как при производстве отдельных реагентов, так и во всех контрольных операциях, напрямую зависит и качество выпускаемой продукции, что требует обязательного наличия на предприятии документов, определяющих требования к воде, используемой на различных стадиях и операциях технологического процесса и правила получения такой воды с использованием соответствующего оборудования (рис. 85).



Рис. 85. Оборудование для водоподготовки

Нормативных документов федерального и отраслевого уровней, устанавливающих требования к форме и содержанию СОП, также еще не существует. Поэтому на каждом предприятии должен быть разработан собственный стандарт построения СОП.

По нашему мнению, в производственную инструкцию в общем случае должны входить следующие разделы:

- Назначение.
- Персонал.
- Технологическая схема стадии (операции).
- Аппаратурная схема стадии (операции) и спецификация оборудования.
- Сырье и материалы.
- Процедура.
- Документация.
- Требования техники безопасности.
- Ответственность
- Литература
- Распределение инструкции

При необходимости перечень разделов может быть изменен.

СОП на реагенты, закупаемые *in bulk*, работа с которыми связана только с их контролем, фасовкой и маркировкой, составляются по той же схеме, что на реагенты собственного изготовления, с той лишь разницей, что описание технологии приготовления ограничивается контролем качества реагента, упаковкой, маркировкой и хранением до комплектации набора.

#### *Рекомендации по содержанию разделов*

##### *Раздел «Назначение»*

Должно быть дано четкое и ясное определение процедуры, которая регламентируется инструкцией (выполнение соответствующей стадии или операции конкретного технологического процесса), а также продукта, получаемого по завершении стадии/операции.

Рекомендуемая редакция:

Настоящая инструкция определяет порядок выполнения стадии (операции) ...указывается обозначение и наименование стадии (операции) по технологической схеме...

Продукт (результат), получаемый по завершении стадии (операции), – ...указывается наименование получаемого реагента с его кратким описанием в

*соответствии с действующими ТУ и ИП..., упакованный и маркированный в соответствии с требованиями ТУ ...указывается № ТУ...*

#### *Раздел «Персонал»*

В данном разделе необходимо перечислить должности исполнителей процедуры, описанной в инструкции, а также должностное лицо, отвечающее за этот участок работы. Допускается использование более общей нормы: "Требования настоящей инструкции распространяются на весь персонал, занятый выполнением указанной работы."

#### *Раздел «Технологическая схема»*

Приводится технологическая схема выполнения описываемой стадии (операции) либо дается ссылка на общую технологическую схему производства соответствующего диагностического препарата, входящую в общий комплект регламентной документации.

#### *Раздел «Аппаратурная схема стадии (операции) и спецификация оборудования»*

Дается Аппаратурная схема (АС) – схематическое изображение всех используемых на стадии (операции) позиций оборудования. Размещение позиций должно соответствовать технологической схеме и описанию процедуры.

На схеме таблицей дается спецификация оборудования, включающая номер позиции по АС, точное (по эксплуатационному документу) наименование позиции (для импортного оборудования – в латинской транскрипции) с указанием ее назначения, необходимого числа ее единиц, типа, марки, фирмы-изготовитель (для импортных позиций – страны), серийного номера (при необходимости), основных технических (эксплуатационных) характеристик (параметров, имеющих прямое отношение к выполняемой процедуре). При наличии специальных требований к оборудованию (чистота, стерильность, герметичность и т.п.) все эти требования должны быть указаны в технических характеристиках. Вместо последних допускается использовать ссылки на ГОСТы, или ТУ, или СОП по эксплуатации соответствующих позиций. Если на одной и той же позиции могут быть использованы различные типы (марки) оборудования, указывается только

общее наименование такого оборудования и основные технологические параметры, которые оно должно обеспечивать). Допускается также представление в виде отдельной позиции группы единиц оборудования, при условии постоянного состава этой группы, напр. "Оборудование для ИФА" со ссылкой на соответствующую СОП, в которой дано перечисление этого состава.

Рекомендуемая редакция таблицы «Спецификация оборудования»:

№ позиции в АС	Наименование	Количество	Марка, фирма-изготовитель (для импортного – страна)	Техническая характеристика (параметры, имеющие прямое отношение к выполняемой процедуре)
1	2	3	4	5

*При наличии соответствующих ГОСТ, или ТУ, или СОП, т.е. документов, в которых излагаются указываемые в таблице параметры, в графе 5 достаточно ссылки на этот документ.*

*При указании в графе 2 общего наименования группы однотипного оборудования в графе 4 указывается "Любой марки, обеспечивающей ..... (указываются заданные технологические параметры, напр., "заданную температуру)", в графе 5 – заданный диапазон этих параметров.*

#### *Раздел «Сырье и материалы»*

Дается полный перечень сырья и материалов, необходимых, для выполнения процедуры, с указанием полного и точного наименования каждой позиции по действующей на нее нормативной документации (словесное наименование реактива может дополняться его химической формулой), спецификации (для отечественных материалов – ГОСТ, ТУ или наименование фирмы-производителя с

указанием каталожного номера; для импортных материалов – наименование фирмы-производителя, страна, каталожный номер) и при необходимости – квалификации (сорт, артикул, чистота и т.п.). При возможности использования ряда спецификаций одной и той же позиции они указываются через союз "или"; при возможности использования любой спецификации последняя не указывается).

Рекомендуется оформлять указанный раздел в виде таблицы «Сырье и материалы»:

п/п	Наименование	Спецификация	Квалификация (при необходимости)
<b>Основное сырье и материалы (позиции, входящие в состав продукта стадии/операции)</b>			
<b>Вспомогательное сырье и материалы (позиции, обеспечивающие производство продукта стадии/операции)</b>			
<p><i>Для отечественных материалов спецификация – ГОСТ, ТУ или наименование фирмы-производителя с указанием каталожного номера; для импортных материалов – наименование фирмы-производителя, страна, каталожный номер. При возможности использования позиции любой спецификации ставится "–."</i></p> <p><i>Квалификация – это сорт, артикул, чистота (ч, хч и т.п.).</i></p>			

## Раздел «Процедура»

Данный раздел должен включать подразделы:

- Подготовка к работе.
- Ход технологического процесса.
- Завершение работы.

Подраздел «Подготовка к работе» определяет порядок подготовки помещений, оборудования и персонала к выполнению технологического процесса.

Рекомендуемая редакция:

*«Подготовить к работе помещения, оборудование и персонал в соответствии с требованиями СОП – ...дается перечисление соответствующих общепроизводственных СОП; если есть какие-то особенности в подготовке отдельных позиций, не отражаемые общими инструкциями, они указываются....»*

Ответственному за проведение работ получить у своего непосредственного руководителя производственное задание и проверить готовность к работе помещений, оборудования и персонала. О замеченных недостатках сообщить непосредственному руководителю и принять меры к их устранению.»

В подразделе «Ход технологического процесса» дается детальное (пошаговое, поэтапное) описание технологического процесса, включая (при необходимости) приготовление и контроль всех вспомогательных растворов, контроль основного сырья и материалов. Описание дается в соответствии с ТС стадии (операции), указываются все контролируемые параметры процесса.

В подразделе «Завершение работы» описывается порядок уборки и, при необходимости, обработки помещений, оборудования и персонала, проводимой по завершении технологического процесса, либо дается ссылка на соответствующую типовую процедуру (при наличии ее описания).

Описание раздела «Процедуры» должно исключать возможность неоднозначного толкования порядка работы, изложенного в нем, в том числе и при возможных вариантах реализации технологического процесса. Описание каждого шага (этапа), результаты которого требуют документирования, должно заканчиваться указанием на необходимость записи результатов выполнения шага (этапа)



в соответствующую заполняемую форму, которая должна быть приведена в приложении к инструкции. Названия позиций используемого оборудования и материалов должны строго соответствовать перечням соответствующих разделов (без указания марок, фирм и спецификаций), названия позиций оборудования должны сопровождаться соответствующими обозначениями (номерах позиций), т.е. после каждого названия должно быть указано «(поз. ... )». При возможности использования типовых для производства описаний стадий, операций (их элементов), изложенных в соответствующих СОП, вместо описаний даются ссылки на эти СОП (вплоть до замены всего содержания подраздела такой ссылкой).

Значения всех измеряемых показателей должны быть приведены с указанием необходимой точности измерения (при измерениях с точностью до 1 – запись величин без десятичных значений, при измерениях с точностью до 0,1 – запись с указанием одного знака после запятой, при измерениях с точностью до 0,01 – запись с указанием двух знаков после запятой и т.д.)

Размерность всех измеряемых показателей должна соответствовать шкалам используемых измерительных приборов. Указываемая точность измерения не должна быть выше класса точности используемого измерительного оборудования. Граничные значения измеряемых величин должны быть указаны либо их диапазоном (измеряемая величина не меньше минимальной и не больше максимальной границы, т.е.  $x_{\min} \leq x \leq x_{\max}$ ), либо их интервалом (измеряемая величина меньше максимальной и больше минимальной границы, т.е.  $x_{\min} < x < x_{\max}$ ), либо их максимально допустимым значением (здесь возможны два варианта – измеряемая величина равна или меньше заданного значения, т.е.  $x \leq x_{\max}$ , или измеряемая величина меньше заданного значения, т.е.  $x < x_{\max}$ ), либо их минимально допустимым значением (здесь также возможны два варианта – измеряемая величина равна или больше заданного значения, т.е.  $x \geq x_{\min}$ , или измеряемая величина больше заданного значения, т.е.  $x > x_{\min}$ ). Не допускается указание максимально допустимого (соответственно, минимально допустимого) значений в виде диапазонов (интервалов) значений.

Рекомендуемая форма записи двусторонних граничных значений:

- для диапазонов – либо "величина в диапазоне от ... $x_{min}$ ... до ... $x_{max}$ ...", либо "величина в диапазоне ... $x_{min}$ - $x_{max}$ ...", либо просто "величина ... $x_{min}$ - $x_{max}$ ..." (например, "температура в диапазоне от 2 до 8 °С", либо "температура в диапазоне 2-8 °С", либо "температура 2-8 °С");
- для интервалов – только "величина в интервале между ... $x_{min}$ ... и ... $x_{max}$ ..."

При отсутствии автоматического измерения и регистрации контролируемого в ходе операции параметра в описании должны быть указания на метод и периодичность его контроля, необходимость регистрации результатов контроля этого параметра в заполняемых формах.

При необходимости контроля качества продукта, получаемого в ходе (после проведения отдельных операций или их элементов) и по окончании всей процедуры, следует указать, кто его контролирует, метод контроля, способ отбора проб и количество отбираемого продукта, а также необходимость регистрации результатов контроля в заполняемых формах.

Если полученный в результате процедуры продукт, является промежуточным продуктом производства, необходимо указать условия его хранения и передачи на следующую стадию. Если полученный в результате процедуры продукт является конечным продуктом производства, следует указать правила его предъявления для приемочного контроля в ОБТК и на склад готовой продукции, требования к условиям его хранения и срок годности в соответствии с действующими ТУ на продукт.

В описании не допускается:

- применение оборотов разговорной речи;
- применение для одного и того же понятия различных научно-технических терминов, в том числе и тождественных по смыслу (синонимов);
- применение сокращений слов, отличных от разрешенных действующими правилами, государственными стандартами.

### *Раздел «Документация»*

В данном разделе указывается, в каких заполняемых формах ведется документирование процесса.

### *Раздел «Ответственность»*

В данном разделе указывается распределение ответственности.

Рекомендуемая редакция раздела:

«Персонал, занятый на работах, описанных в настоящей инструкции, несет ответственность за выполнение ее требований в соответствии с действующими правилами.»

### *Раздел «Литература»*

В данном разделе дается перечень нормативных документов, на которые даны ссылки в тексте инструкции (обязательный перечень), и ссылки на справочную литературу, которая может быть полезна при проведении работ по данной СОП (рекомендуемый перечень).

Все документы обязательного перечня должны быть составной частью системы документации предприятия и быть доступны для действующего персонала предприятия.

### *Раздел «Распределение инструкции»*

Дается перечень структурных подразделений, в которые должна быть передана инструкция, и количество копий, необходимое для каждого подразделения.

Рекомендуется оформлять указанный раздел в виде таблицы:

Подразделение	Экземпляр	Чи сло

Рекомендуется оформлять СОП с использованием верхних и нижних колонтитулов:

<i>Форма верхнего колонтитула первой страницы</i>		
<i>... Сокращенное название предприятия ...</i>		
<b>Производственная инструкция</b>		
<b>Регламент производства...дается торговое наименование продукта и № регламента, указанный в ТУ...</b>		
<b>Стадия (операция)...дается № и наименование стадии (операции) по технологической схеме...</b>		
Дата введения:	СОП- ...дается код и № документа...	Стр. ... из ...
Версия № ... Введено /впервые или вместо.../	Действительно до:	Копия № ...

*Если в ТУ не указан номер регламента, регламенту присваивается номер, состоящий из порядкового номера по перечню регламентов предприятия и года (через тире) ТУ на продукт: "ПР № ...-....".*

*Если СОП описывает процедуру, типовую для группы препаратов, или для какого-либо производственного подразделения, или для всего производства, в третьей сверху строке колонтитула указывается "Регламенты производства ...указывается группа продуктов, для которых эта процедура является типовой, либо соответствующее производственное подразделение, либо все производство. При этом в четвертой сверху строке колонтитула не указывается номер стадии (операции).*

*Форма нижнего колонтитула первой страницы*

<b>Составил (изменил)</b>	<b>Согласовал</b>	<b>Утвердил</b>
...должность.	1...должность.	...должность.
...ФИО подпись...	...ФИО подпись...	...ФИО подпись...
...дата...	...дата...	...дата...
	2...должность.	
	...ФИО подпись...	
	...дата...	
	3...должность.	
	...ФИО подпись...	
	...дата...	
	...указываются все со- гласующие лица..	

*Форма верхнего колонтитула последующих страниц та же, что и на первой странице, но без первой строки (названия предприятия)*

*Форма нижнего колонтитула последующих страниц*

Составил (изменил)	Согласовал	Утвердил
...только подпись...	...только подпись...	...только подпись...

\*\*\*

*Нормативные документы, которые могут быть использованы при подготовке производства*

Как уже говорилось, нормативных документов федерального уровня, определяющих требования к подготовке производства именно МИ<sub>ивд</sub>, еще не существует.

Частично ориентирами для организации выполнения всех мероприятий по подготовке производства могут быть требования ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации».

Ответы на отдельные вопросы можно найти также в ГОСТ 15467-79 «Управление качеством продукции. Основные понятия. Термины и определения», ГОСТ Р ИСО 9000-2001 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь», ГОСТ Р ИСО/ТО 10013-2007 «Менеджмент организации. Руководство по документированию системы менеджмента качества».

Может быть полезным также обращение к соответствующим разделам нормативных документов, определяющих правила организации производства лекарственных средств, разумеется, с учетом принципиального отличия МИ<sub>ивд</sub> от всей прочей продукции медицинского назначения. Назначение МИ<sub>ивд</sub>, в отличие от лекарственных средств и всех прочих МИ, в принципе, исключает прямое или опосредованное воздействие на организм пациента, и, соответственно, выполнение всех требований к производству лекарственных средств, связанных с обеспечением безопасности их применения, при производстве МИ<sub>ивд</sub> может быть необязательным.

### ***2.5.1.3. Государственная регистрация продукции***

Завершающим этапом организации производства МИ<sub>ивд</sub> является получение регистрационного удостоверения (РУ) на него, дающего допуск этого продукта на Российский рынок товаров медицинского назначения, т.е. дающего право производить и реализовывать этот продукт в Российской Федерации.

Государственная регистрация МИ<sub>ивд</sub> до последнего времени выполнялась по правилам, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416. Но поскольку в связи с необходимостью оптимизации условий обращения продукции медицинского назначения на экономическом пространстве государств-членов Евразийского экономического союза был начат процесс гармонизации нормативной документации, регламентирующей указанное обращение, и этот процесс, необходимо затрагивающий также соответствующие документы Российской Федерации, еще далек от завершения, давать в настоящем пособии какие-то рекомендации по поводу процедуры регистрации МИ<sub>ивд</sub> явно преждевременно.

То же, по-видимому, следует сказать и о процедурах сертификации производств МИ<sub>ивд</sub> на соответствие требованиям стандартов системы менеджмента качества продукции, в частности ГОСТ Р ИСО 13485-2011 «Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Системные требования для целей регулирования», который является отечественной версией соответствующего международного отраслевого стандарта, разработанного Международной организацией по стандартизации (ISO 13485-2003).

С учетом современных взаимоотношений Российской Федерации с Европейским союзом и США, начатый еще в конце прошлого столетия процесс гармонизации отечественных требований к организации обеспечения качества промышленной продукции с системами обеспечения качества, действующими у наших нынешних оппонентов, может потерять былую актуальность, а поэтому может потерять актуальность и соответствующая сертификация отечественных производств.

По нашему мнению, такие «потери» вовсе не грозят Российской промышленности какими-то реальными потерями, поскольку, как показывает анализ рекомендуемых нам образцов регламентации правил «менеджмента качества продукции», они по сути своей просто перелицованы с действовавшей в Советском Союзе системы стандартов управления качеством продукции, при чем перелицо-

ваны с изрядной добавкой откровенной формалистики. Как ни странно, это обстоятельство совершенно не учитывается при проведении упомянутой «гармонизации», которая в большинстве случаев сводится к механическому переводу текстов Западных стандартов на русский язык, при чем перевода, сделанного явно не знатоками проблемы управления качеством продукции, но, по-видимому, считающими, что включение в документы всяческих англицизмов типа «менеджмент качества», «валидация», «верификация» и т.п. делает его более представительным. К сожалению, результатом такой «гармонизации» явилась масса нормативных документов, весьма сложно воспринимаемых персоналом, который обязан использовать их в своей работе, хотя конечным эффектом такого использования нередко является одно лишь увеличение объема бумажной документации, сопровождающей производство, причем этот эффект никак не сказывается на качестве выпускаемой продукции.

### **2.5.2. Производство МИ<sub>ивд</sub> из крови животных-продуцентов**

В практике современной медицины широко применяются лечебно-профилактические и диагностические препараты, изготовленные либо из крови животных, либо с ее использованием.

Сказанное справедливо и для иммунохимических исследований – реагенты, полученные из крови животных, нередко входят в соответствующие наборы или используются в технологических процессах их производства.

Кровь-сырье получают либо при забое животных на скотобойнях (птица, крупный рогатый скот), либо от специальных животных-продуцентов. Чаще всего в качестве последних используются морские свинки, кролики, бараны и козлы, крупный рогатый скот, лошади.



### *2.5.2.1. Основные требования к содержанию животных-продуцентов*

В Российской Федерации нет специальных документов, регламентирующих правила содержания животных-продуцентов, но в этих целях могут использоваться такие документы как СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 № 51, и РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации Минсельхоза РФ по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений», утвержденные заместителем Министра сельского хозяйства РФ А. И. Беляевым 1.12.2009 г.

Следует отметить, что выполнение требований указанных документов обеспечивает не только качество выпускаемого продукта, но и соблюдение основных требований деонтологии – науки об основных морально-этических аспектах взаимоотношений человека с животными как частью окружающего нас мира.

Животное-продуцент должно иметь среду обитания, соответствующую его физиологическим и этологическим<sup>14</sup> потребностям, в том числе укрытие от неблагоприятного действия факторов внешней среды и, как минимум, некоторую свободу движения, питание, воду и уход, соответствующий его видовым потребностям, здоровью и состоянию. Всякое ограничение его способности удовлетворять свои физиологические и этологические потребности должно быть минимизировано. Условия среды обитания продуцента должны контролироваться ежедневно.

Необходимые условия содержания продуцентов обеспечиваются при размещении вивариев в соответствии с требованиями СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03

---

<sup>14</sup> Этология — наука о поведении животных, изучающая главным образом генетически обусловленное поведение (инстинкты) животных и эволюцию поведения.

«Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 25.09.2007 № 74.

При планировке и размещении помещений вивария обеспечивается соблюдение принципа разделения площадей на «чистые» и «грязные» помещения и предусматриваются условия, исключающие встречные или перекрестные потоки перемещений оборудования, инвентаря, материалов, персонала вивария, лабораторных животных с различной степенью эпидемиологической опасности из «грязных» в «чистые» помещения.

В состав «чистых» помещений входят:

- помещения приёма, карантина и адаптации вновь поступающих животных;
- помещения экспериментальных животных;
- операционная с предоперационной для экспериментальных работ, требующих особых условий;
- помещения хранения чистого (обеззараженного) инвентаря для ухода за животными (клеток, поилок, посуды для кормов, оборудования);
- помещение манипуляционной для изучения обменных процессов, взятия проб для анализа;
- помещения для хранения и приготовления кормов для животных;
- диагностический кабинет;
- помещение или оборудованная выделенная зона для испытуемых образцов (биологические материалы) и образцов сравнения.

В составе «грязных» помещений предусматриваются:

- помещения изоляторов, предназначенные для содержания подозрительных по инфекционным заболеваниям животных или больных животных;
- помещение (или отделение) для мойки и дезинфекции оборудования и инвентаря;
- холодильное помещение или холодильная камера для сбора и хранения трупов животных, отходов;

- помещения для персонала вивария (душевая, туалет и гардеробная).

Помещения для мойки и дезинфекции оборудования и инвентаря располагаются на стыке «чистых» и «грязных» помещений для обеспечения перемещения «чистого» и «грязного» оборудования, инвентаря, материалов, а также животных и трупов животных.

Помещение для хранения чистого инвентаря рекомендуется размещать рядом с помещением (отделением) для мойки и дезинфекции оборудования.

К помещениям и оборудованию предъявляются следующие санитарно-гигиенические требования:

- Используемые строительные и отделочные материалы должны быть безвредными для здоровья человека. Материалы для внутренней отделки должны быть устойчивыми к проведению уборки влажным способом и обработке моющими и дезинфицирующими средствами, в том числе обработке водой под давлением.

- Потолки, стены и полы всех помещений должны быть гладкими, водонепроницаемыми, без нарушения целостности, признаков поражения грибком.

- Стыки при отделке стен, пола и потолка должны быть плотно подогнаны и иметь закругления (галтели) для обеспечения качественной уборки и дезинфекции.

- Полы в помещениях и коридорах вивариев должны быть устойчивы к механическим воздействиям.

- В помещениях должны поддерживаться установленные параметры микроклимата, в частности в помещениях для содержания морских свинок должна поддерживаться температура воздуха в пределах 20-26 °С, для кроликов – 16-22 °С, для сельскохозяйственных животных 16-27 °С; относительная влажность должна находиться в пределах 30-70 %.

- Помещения вивария должны быть оборудованы системами хозяйственно-питьевого, горячего водоснабжения и канализации.

- Уровни естественного и искусственного освещения на рабочих местах работников вивария должны соответствовать гигиеническим требованиям к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий, за исключением рабочих мест в помещениях для содержания лабораторных животных.

- Виварии должны быть обеспечены специальным оборудованием для дезинфекции клеток, инвентаря, оборудования, а также условиями для сбора, хранения, удаления (утилизации) отходов и трупов животных.

- Помещения, предназначенные для содержания животных, должны иметь соответствующую маркировку. Доступ в помещения для содержания животных должен быть ограничен определенным кругом лиц, закрепленных за данными помещениями.

Мойка и дезинфекция клеток, кормушек, поилок и другого инвентаря должна производиться после каждого их использования в помещении (отделении) для мойки и дезинфекции оборудования и инвентаря с применением моющих и дезинфицирующих средств, при этом

Методы и способы дезинфекции, дезинсекции, режим автоклавирования и используемые дезинфекционные, дезинсекционные и моющие средства не должны оказывать вредного воздействия на здоровье работников вивария и животных.

Ежедневно должна производиться уборка всех помещений вивария с применением моющих и дезинфицирующих средств. За каждым помещением для содержания животных должен быть закреплен промаркированный уборочный инвентарь, для хранения которого должны быть отведены специальные места.

В помещениях, в которых обнаружены больные животные, должна быть проведена дезинфекция в соответствии с указаниями ветеринарного врача. При массовых заболеваниях животных, или при обнаружении у них случаев инфекционных заболеваний, опасных для животных и человека, в виварии должен быть

проведен необходимый комплекс противоэпидемических мероприятий по требованию ветеринарной службы. Решение о лечении или уничтожении больных животных в каждом конкретном случае принимается ветеринарным врачом.

При организации сбора, временного хранения, обеззараживания, обезвреживания и транспортирования отходов, образующихся при осуществлении деятельности в виварии, должны соблюдаться СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 09.12.2010 № 163.

В помещениях вивария должны быть созданы условия для мытья рук персонала. Около раковин для мытья рук, в том числе в туалетах, должны быть постоянно мыло и одноразовые бумажные салфетки.

Работники вивария должны проходить предварительные (при поступлении на работу) и периодические медицинские осмотры в порядке, установленном Приказом Минздравсоцразвития России от 12.04.2011 № 302н «Об утверждении перечней вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры (обследования), и порядка проведения обязательных предварительных и периодических медицинских осмотров (обследований) работников, занятых на тяжелых работах и на работах с вредными и (или) опасными условиями труда».

Стадо продуцентов формируется только из животных, которые получены в хозяйствах, специализирующихся на их разведении и имеющих официальное разрешение на указанную деятельность, животные должны иметь ветеринарное свидетельство.

Вновь поступившие животные должны быть осмотрены ветеринарным врачом и изолированы в помещения для карантина. Животных выдерживают в карантине 45 суток. За это время их всесторонне обследуют с ежедневным (утром и вечером) двукратным измерением температуры тела, проверяют на пораженность гельминтами и при необходимости дегельминтизируют.

Лошадей исследуют на сап, трихомоноз, бруцеллез, туберкулез, пироплазмидозы, инфекционную анемию; крупный рогатый скот - на туберкулез, бруцеллез, лептоспироз; свиней - на туберкулез, бруцеллез; овец – на бруцеллез, туберкулез, паратуберкулез; кроликов – на пастереллез; морских свинок – на бруцеллез, листериоз и др.

При отборе животных-продуцентов учитывают их физиологические и иммунобиологические показатели. На момент начала исследований все животные должны быть здоровы и не представлять опасность для работников виварии.

Тщательность и периодичность наблюдения за состоянием здоровья продуцента должны гарантировать своевременное выявление любых отклонений от нормы. При выявлении таких отклонений продуценту должна быть своевременно и в полном объеме оказана необходимая ветеринарная помощь.

Кормление животных-доноров осуществляется по специально разработанным рационам. Такие рационы, кроме необходимого числа кормовых единиц должны также включать сочно-витаминные корма и быть строго сбалансированными по минеральному составу.

Кормят животных-продуцентов 3-5 раз в день, водопой - вволю, соль лизунец - вволю (кроме свиней).

Крупных животных содержат индивидуально, мелкий рогатый скот и свиней – группами, кроликов и морских свинок – в клетках.

Обязательным элементом содержания стада продуцентов является ведение их реестра, в котором указываются вид, порода (любые иные генетические характеристики, влияющие на качество биологического сырья), количество животных, источники и даты получения животных, отмечается время их использования до исключения из реестра.

При групповом содержании продуцентов в клетках, последние должны быть маркированы с указанием вида животных, количества животных в клетке, источника и даты получения; маркировка должна исключать возможность ошибочного использования любой группы продуцентов для проведения соответствующих процедур вне утвержденного графика.

При индивидуальном содержании продуцентов в клетках, стойлах и т.п., а также при любом групповом содержании крупных продуцентов (животных массой 1 кг и более) должно быть маркировано каждое животное. Маркировка должна содержать все сведения о продуценте, исключающие возможность его использования вне утвержденного для него графика процедур использования. При необходимости индивидуальной маркировке могут быть подвергнуты все животные, независимо от их массы.

#### *Процедуры (технологические процессы) использования продуцентов*

Методики и технологии предварительной подготовки продуцентов и периодического отбора биологического сырья должны минимизировать возможные неблагоприятные последствия указанных процедур как для здоровья и состояния продуцента, так и для качества отбираемого сырья. Забой продуцентов для посмертного отбора биологического сырья или по иным причинам должен выполняться наименее болезненными способами.

Если процедуры предварительной подготовки продуцентов и отбора биологического сырья необходимо связаны с причинением продуценту боли, обязательно использование местной или общей анестезии препаратами, использование которых не влечет за собой последующего негативного воздействия на состояние продуцента и не влияет на качество получаемого сырья.

Процедурам предварительной подготовки и отбора биологического сырья подвергаются только здоровые продуценты.

Если процедуры использования необходимо связаны с нарушением состояния здоровья продуцента, по завершении манипуляций с продуцентом условия его содержания (включая при необходимости лечебные мероприятия) должны обеспечить полное восстановления состояния здоровья продуцента.

Для каждой группы продуцентов или для каждого отдельного продуцента составляется график проведения процедур использования. График составляется на основе известной из специальной литературы информации о физиологии используемого вида продуцентов и опыта их практического использования. График утверждается руководителем вивария (скотного двора).

Процедура получения диагностических препаратов из крови животных-продуцентов выполняется в несколько этапов:

- отбор животных-продуцентов,
- грундиммунизация (грунди́рование) - создание у животных-продуцентов основы иммунитета,
- гипериммунизация животных-продуцентов,
- взятие крови,
- приготовление диагностических препаратов.

При отборе животных прежде всего проверяют их иммунный статус – серологическими методами определяют наличие антител к тому или иному антигену.

При проведении грундиммунизации животным вводят убитые или живые аттенуированные микроорганизмы. Их обычно вводят дважды, с интервалом в 2-3 недели, внутримышечно или подкожно.

До начала грундиммунизации и через 7-8 суток после последнего введения антигенов определяют в сыворотке крови продуцента наличие антител к тому антигену, с помощью которого в последующем готовят гипериммунную сыворотку.

Выявление после грундиммунизации в сыворотке крови антител в титрах 1:800 и выше указывает на то, что данное животное может быть использовано как продуцент гипериммунной сыворотки, т.е. такое животное обладает высокой реактивностью организма и иммунная система его способна вырабатывать антитела в необходимых титрах.

Кроме того, организм животного сенсibilизируется («знакомится») антигеном и при последующей гипериммунизации быстро ответит на введение антигена выработкой антител.

Предварительное, правильно проведенное грунди́рование животных обеспечивает повышение (в 5 раз и более) титров специфических антител при последующей гипериммунизации тем же антигеном, увеличивает выход высокоактивного препарата и создает условия получения необходимого объема сывороток в более короткие сроки.



Гипериммунизация животных – это метод парэнтерального введения животным нарастающих доз соответствующих антигенов с целью получения наивысшей ответной иммунологической реакции организма, а следовательно, и максимального увеличения в крови животных титра специфических антител.

При гипериммунизации в сыворотке крови обычно нарастает количество общего белка, увеличивается количество гамма- и бета-глобулиновых фракций, уменьшается содержание альбуминов. Так, если в нормальной сыворотке крови лошадей альбумины составляют 50 % от общего количества белков, то в иммунной сыворотке их бывает 35 % и ниже.

Успех гипериммунизации животных-продуцентов зависит не только от тщательного их подбора, качества антигена и адьювантных веществ, но и от правильно выбранной схемы гипериммунизации, правильной технологии выполнения этих схем иммунизации, а также технологии кровопускания или обескровливания продуцентов в конце их эксплуатации.

Антиген вводится обычно подкожно или внутримышечно (иногда внутривенно) в несколько мест с таким расчетом, чтобы точки инъекции находились вблизи лимфатических узлов. При этом, в иммуногенез быстрее вовлекается большое количество лимфоузлов, что повышает общую и иммунологическую реактивность организма. Введение антигена одновременно в несколько мест, кроме того, обеспечивает лучшую рассасываемость его и появление более равномерных и менее болезненных инфильтратов. Антигены в небольших дозах (5-25 мл) обычно вводят подкожно в верхнюю часть шеи животного или внутривенно, а в больших количествах - внутримышечно в область спины и крупа.

Для гипериммунизации чаще всего используют лошадей. Цикл гипериммунизации обычно длительный и составляет 1-2 и более месяцев, но в каждом конкретном случае длительность цикла зависит от вида получаемой гипериммунной сыворотки.

В каждом конкретном случае могут быть разными и схемы иммунизации. Они могут отличаться даже при получении одного и того же наименования сыворотки, т.к. для разных животных могут требоваться разные схемы.

Введение антигенов обычно не вызывает резких отклонений в состоянии здоровья крупных животных, лишь иногда наблюдаются местные и общие реакции. Эффективность иммунизации животных повышается при дробном введении антигенов одновременно в различные участки тела с охватом возможно большего количества лимфоузлов.

По окончании гипериммунизации, когда в сыворотке крови животного установлен максимальный титр специфических антител (обычно через 7-10 суток после последней инъекции антигена), у него берут кровь. Этот период соответствует максимальному накоплению антител в крови животных и полностью укладывается в закономерности иммуногенеза.

Количество забираемой крови зависит:

- от массы животного;
- от привычки его к кровопотерям с учетом начального и последующих циклов;
- количества предполагаемых кровопусканий в данном цикле;
- количества титра антител;
- состояния здоровья животного.

К взятию крови животных приучают постепенно. Например, у лошадей кровь обычно берут из яремной вены из расчета 800 мл на каждые 50 кг массы животного (или 13 % к общей массе крови животного).

Тотальное обескровливание чаще проводят при использовании мелких животных, а также тогда, когда решается вопрос о прекращении использования крупных животных как продуцентов. Обычно это делают на пике накопления антител.

При отсутствии в специальной литературе информации о рекомендуемой периодичности отбора биологического сырья у используемого вида продуцентов и о предельно допустимом числе таких отборов у одного и того же продуцента или о предельном сроке использования продуцента эти параметры графика использования определяются опытным путем через оценку влияния процедур ис-

пользования на состояние здоровья продуцента, через оценку времени, необходимого для полного восстановления состояния здоровья и нормализации всех физиологических параметров продуцента после каждой последующей процедуры, а также через оценку влияния параметров графика использования продуцента на качество получаемого от него сырья. Все исследования, проводимые в интересах указанных оценок, должны быть запротоколированы; протоколы исследований должны быть утверждены руководством предприятия, выпускающего продукцию медицинского назначения с использованием соответствующего биологического сырья; утвержденные протоколы должны храниться на предприятии в течение всего времени выпуска указанной продукции с учетом гарантированных сроков хранения последней выпущенной серии.

В любом случае каждая последующая процедура использования может быть проведена только после полного восстановления состояния здоровья и нормализации всех физиологических параметров продуцента.

Последним допустимым периодическим отбором сырья следует считать тот, после которого время, необходимое для восстановления состояния здоровья и нормализации всех физиологических параметров продуцента, делает дальнейшее содержание его экономически невыгодным (расходы на его содержание будут превышать потенциальную прибыль от реализации соответствующей продукции медицинского назначения). По достижении указанной даты производитель исключается из реестра. При этом, если дальнейшее его использование в иных целях или его содержание без практического использования невозможны, непосредственно после отбора биологического сырья животное должно быть забито.

#### *Требования к организации содержания и обслуживания продуцентов*

Структура, штатное расписание и штатная численность персонала подразделений, занятых содержанием и использованием продуцентов, определяется руководством предприятия, выпускающего продукцию медицинского назначения с использованием соответствующего биологического сырья.

Все аспекты деятельности указанных подразделений должны быть отражены в комплекте организационной и технологической документации, включающей должностные инструкции всех категорий сотрудников, занятых содержанием и использованием продуцентов, а также инструкции по выполнению всех процедур их содержания и использования.

Штатное расписание и штатная численность персонала, занятого содержанием продуцентов, определяется действующими в РФ нормативами обслуживания лабораторных и сельскохозяйственных животных, аналогичных или сходных по анатомо-физиологическим характеристикам используемым продуцентам.

Штатное расписание и штатная численность персонала, занятого использованием продуцентов, определяется, исходя из сложности и трудоемкости процедур использования продуцентов и численности используемых животных.

Персонал, занятый в процедурах содержания и использования продуцентов, должен иметь соответствующую образовательную и профессиональную подготовку.

Руководство предприятия, производящего продукцию медицинского назначения, обеспечивает комплектование персонала, занятого содержанием и обслуживанием продуцентов (персонал вивария) и разработку программ его технической учебы.

Руководство вивария организует техническую учебу персонала в соответствии с разработанными программами и периодическую (не реже 1 раза в год) проверку его квалификации.

#### ***2.5.2.2. Правила отбора крови***

Прежде всего необходимо соблюдать правила асептики – место взятия крови должно быть обработано (выстригание и выбривание волосяного покрова, протирание кожи спиртом и эфиром или смазывание настойкой йода), отбор крови должен выполняться стерильным инструментом в стерильную посуду. Инструментарий и посуда для взятия крови, кроме этого, должны быть безукоризненно чистыми и хорошо обезжиренными.

Для мытья пробирок и прочей стеклянной посуды лучше всего использовать *хромтик* – раствор двуххромовокислого калия (около 1%) в концентрированной серной кислоте. Рекомендуется иметь в лаборатории заранее приготовленный насыщенный водный раствор двуххромовокислого калия, который разводится концентрированной серной кислотой (разводить следует очень осторожно, так как жидкость сильно нагревается). После остывания ею можно пользоваться до тех пор, пока она не изменит коричневатого-красного цвета на зеленоватый.

Новые резиновые пробки для лабораторной посуды идут с тальковым покрытием, поэтому перед использованием их необходимо промывать в воде для удаления порошка. Затем пробки кипятят 5 минут в растворе разбавленной щелочи (0,5-нормальный раствор), которую затем отмывают водой. Снова кипятят 5 минут в разбавленной (1:25) соляной кислоте и промывают в проточной воде до нейтральной реакции стекающей жидкости. После такой обработки резиновые пробки очень быстро портятся, поэтому их нельзя заготавливать много, разумнее производить их подготовку только в количестве, достаточном для планируемого применения; подготовленные пробки (особенно в теплое время года) следует держать до использования в плотно закрытой таре в прохладном месте.

Кровь обычно отбирают за 2-3 ч до кормления животных. У крупных сельскохозяйственных животных кровь отбирают в стоячем положении, в специальном станке (рис. 86, 87) или в стойле.



Рис. 86. Станок для взятия крови у коров

Беспокойных животных фиксируют на месте с помощью закруток и носовых зажимов, а пугливым животным завязывают глаза. У мелких животных взятие крови лучше производить, привязав их к столу или специальному станку.



Рис. 87. Станки для фиксации лошадей

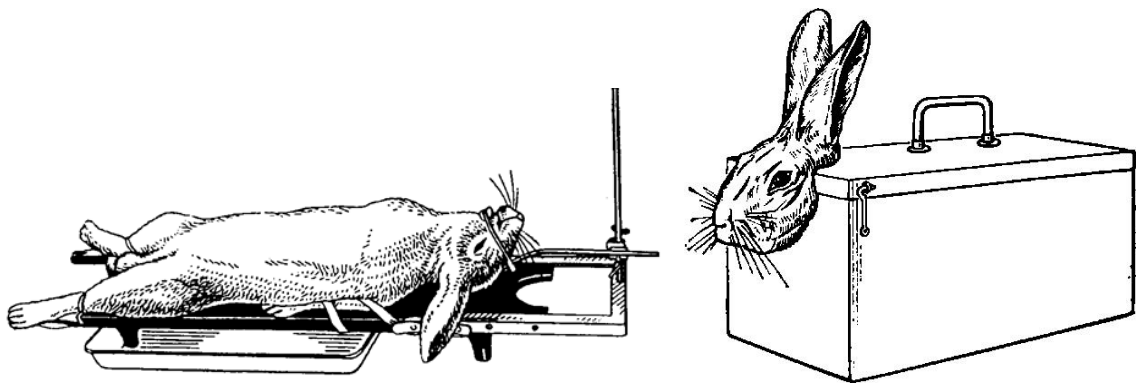


Рис.88. Различные способы фиксации кроликов

Взятие крови производится различными способами.

Небольшое количество крови у лошадей и крупного рогатого скота берут из вены угла глаза. Для этого нажатием пальца кровь задерживают в вене, которую прокалывают иглой. Обычно же малые объемы крови у крупного рогатого скота, коз и овец берут из сосудов внутренней или наружной поверхности уха при помощи небольшого разреза скальпелем. Получение крови возможно также путём надреза края уха. У кроликов малые объемы крови получают из ушной вены, у морских свинок - из сердца, иглами соответствующего диаметра и длины, пункцию сердца у кроликов используют также для получения большего объема крови. У крупного рогатого скота кровь можно взять также из разреза ножницами хвостовой складки.

Важно знать особенности забора крови разными методами у разных животных.

Так, для забора крови у *баранов из яремной вены* перед пункцией на шее барана на уровне яремной вены тщательно выстригают шерсть. Голову барана откидывают назад, на шею накладывают нетугой резиновый жгут, поверхность кожи над набухшей веной очищают ваткой, смоченной спиртом. Вату фиксируют пальцами левой руки, в правую берут иглу, соединенную с устройством для взятия крови, и прокалывают ею кожу и вену. С момента поступления крови во флакон жгут ослабляют, кровь должна стекать по стенке флакона. Флакон во время взятия крови постоянно встряхивают. От каждого барана отбирают не более 400 мл крови. Набрав достаточное количество крови, снимают жгут, вынимают иглу



из вены, для предупреждения гематомы место прокола прижимают ваткой, смоченной спиртом, затем обрабатывают окружающую поверхность йодом

Для получения крови *из краевой вены уха кролика* нужно, прежде всего, вызвать гиперемия уха, потирая его ладонями рук и слегка ударяя кончиками пальцев. Затем вдоль наружного края уха удаляют пушок и протирают ватой, увлажненной 70% спиртом. Если в результате всех перечисленных процедур сосуды не инъецируются, ухо смазывают ксилолом или толуолом. После того как сосуды набухнут и четко обозначатся на поверхности ушной раковины, наружную поверхность ее покрывают тонким слоем жидкого парафина (во избежание быстрого свертывания крови) и делают прокол вены. Для получения небольшого количества крови (менее 1 мл) прокалывают одну из небольших периферических ветвей, а для получения больших объемов крови (5-10 мл) вскрывают краевую вену уха. С этой целью иглу шприца вводят в вену почти параллельно поверхности уха, чтобы не повредить противоположную стенку вены. При проколе вены иглой шприца кровь, как правило, выходит отдельными каплями с большими интервалами, и кровотечение прекращается быстро. Для того, чтобы вызвать обильное кровотечение, нужно сделать ранку с рваными краями. С этой целью пользуются обломком тонкого капилляра пастеровской пипетки. При таком способе прокола из уха кролика получают до 30 мл крови. После взятия крови к проколу вены прикладывают на 2-3 минуты кусочек сухой стерильной ваты, не нажимая сильно на стенку сосуда, так как при этом кровотечение может усилиться. Если кровотечение долго не прекращается, хорошие результаты дает нанесение на ранку нескольких капель перекиси водорода.

Для *пункции сердца* животных фиксируют к доске брюшком кверху. Шерсть в области груди тщательно выстригают, кожу обрабатывают спиртовым раствором йода и после этого приступают к проколу, который в зависимости от вида животного имеет некоторые различия.

При *пункции сердца у кроликов* определяют указательным пальцем, обработанным спиртом и смазанным спиртовым раствором йода, сердечный толчок,

т. е. точку наиболее сильно выраженной пульсации сердца. Обычно она прощупывается в третьем межреберье. Прокол грудной клетки делают в области сердечного толчка на расстоянии 2-4 мм от левого края грудины; иглу ведут в направлении к средней линии на глубину 2-2,5 см. При попадании иглы в полость сердца рука, в которой находится шприц, начинает ощущать ритмичные толчки, связанные с пульсацией сердца и приподнимающие иглу. Поршень шприца легко выдвигается наружу и в цилиндре его тотчас появляется кровь. Взяв необходимое количество крови, быстрым движением, без рывка, вынимают иглу и на место укола накладывают ватный тампон, пропитанный спиртовым раствором йода. Животному подкожно вводят подогретый до температуры тела стерильный изотонический раствор хлорида натрия или глюкозу в количестве, равном двойному объему взятой крови. Пункцией сердца можно получить у кролика 25-30 мл крови.

При *пункции сердца у морских свинок* кончиками среднего-безымянного пальцев левой руки нащупывают сердечный толчок, в направлении которого вертикально на глубину 1,5-2 см вкалывают иглу, отступя на 1-2 мм от левого края грудины. У морских свинок можно получить таким образом 10-12 мл крови.

При необходимости прибегают к полному, или тотальному, обескровливанию, после которого животное погибает.

При *тотальном обескровливании кролика* вскрывают одну из сонных артерий, расположенных по обеим сторонам трахеи. Для получения стерильной крови руки оперируемого должны быть тщательно вымыты и обработаны спиртом или спиртовым раствором йода, все инструменты предварительно необходимо простерилизовать. Подготовленного для кровопускания кролика привязывают станку брюшком кверху, фиксируя голову кольцом к штативу. Шерсть на шее тщательно выстригают, кожу дезинфицируют. К носу животного прикладывают кусочек ваты, смоченной эфиром. После того как наступит состояние наркоза, скальпелем делают разрез по средней линии шеи и разводят края раны пинцетом. Сонные артерии проходят по бокам трахеи в яремном желобке между

венной и нервом. Сверху артерия прикрыта грудино-подъязычной и грудино-щитовидной мышцами. Поэтому для обнаружения нервно-сосудистого пучка эти мышцы разделяют тупым концом скальпеля или браншами пинцета. Артерию освобождают от окружающей соединительной ткани и подводят под нее две лигатуры. Ближайшую к головке лигатуру завязывают двойным узлом, позади второй лигатуры на расстоянии 0,3-0,5 см накладывают зажим. Между лигатурой и зажимом маленькими остроконечными ножницами делают продольный разрез сосуда длиной не более 1,5-2 мм, вставляя в него канюлю (стеклянную трубочку с оттянутым капилляром, кончик которой скошен и хорошо оплавлен). Кончик вставленной канюли укрепляют второй лигатурой. После этого под резиновую трубку, надетую на расширенную часть канюли, подставляют пробирку или флакон и снимают зажим с артерии, чтобы кровь могла вытекать свободно.

Обескровливание морских свинок производят так же, как и кроликов.

Большие объемы крови у лошадей, крупного и мелкого рогатого скота можно отбирать из яремной вены, расположенной над трахеей в так называемом яремном желобе. Животное коротко привязывают, голову держат за рога или недоуздок, а если нужно, используют другие способы фиксации. Затем у основания шеи животного накладывают резиновый жгут или ремень и, не завязывая его концы узлом, затягивают до тех пор, пока яремная вена не нальется кровью и не будет прощупываться в яремном желобе в виде мягкого шнура.

Правой рукой вводят острую иглу в яремную вену по направлению снизу вверх и вперед, на глубину приблизительно 4 см. При удачном вводе иглы кровь струйкой вытекает через отверстие и собирается в подставленную под иглу стерильную емкость. Если же после ввода кровь через иглу не поступает, иглу поворачивают вокруг оси и попеременно продвигают то несколько вперед, то назад, пока из нее не появится кровь. Чтобы кровь не вспенивалась, ее струйку следует направлять на стенку сосуда, каждую емкость заполняют обычно на 2/3 ее вместимости. По завершении отбора крови резиновый жгут быстро ослабляют, вену зажимают пальцами левой руки выше места ввода и быстрым движением вынимают иглу, а кожу на месте ввода смазывают настойкой йода.

Важная деталь процедуры – кровь от разных животных не смешивают! Идентифицируют взятую кровь указанием номера животного на флаконе маркером.

### ***2.5.2.3. Приготовление диагностических препаратов из цельной и дефибринированной крови***

Цельная кровь, вышедшая из кровеносных сосудов, быстро сворачивается, разделяясь на кровяной сгусток (эритроциты и фибрин, образовавшийся из фибриногена цельной крови) и сыворотку, которая чаще всего и используется для получения реагентов, входящих в наборы для иммунохимических исследований

Сыворотка лучше отделяется, если перед взятием крови стенки сосуда, в который собирается кровь, смочить теплым физиологическим раствором. Сосуды для взятия крови должны иметь комнатную температуру, так как иначе эритроциты могут прилипнуть к стенкам сосуда и лизироваться. Отобранную кровь ставят выдерживают 1 ч при температуре 35-37°C. Затем переносят ее в холодильник и выдерживают 4 ч при 2-8°C. Для лучшего отделения сыворотки образовавшийся кровяной сгусток отделяют от стенок пробирок, обводя его стеклянной палочкой или проволокой. Если в сыворотку все же попали эритроциты, ее центрифугируют при 1000-1500 об/мин в течение 10-15 мин.

Для более быстрого получения сыворотки свернувшуюся кровь можно сразу центрифугировать при 2000-2500 об/мин в течение 15-20 мин.

При необходимости длительного хранения полученной сыворотки ее можно консервировать. В качестве консервантов применяют мертиолят, тимол, борную кислоту и другие вещества. Консервант добавляется в очень малых количествах. Сыворотка также хорошо сохраняется при глубоком замораживании – до минус 20°C или еще ниже.

Если целью отбора крови является получение эритроцитарной взвеси, полученную кровь либо стабилизируют антикоагулянтами (гепарином, лимонно-

кислым натрием, щавелевокислым натрием, или калием, или аммонием), небольшие объемы которых вносят в емкость перед забором крови, либо дефибринируют.

Стабилизированная кровь после длительного отстаивания или центрифугирования разделяется на форменные элементы (внизу пробирки) и плазму (вверху), используемые в соответствии с применяемой технологией производства.

*Получение дефибринированной крови.* Кровь животного сливают в стерильную емкость со стеклянными бусами и непрерывно в течение 10-15 мин встряхивают. При этом фибриноген крови превращается в фибрин, который выпадает в осадок, обволакивая бусы, а дефибринированная кровь, слитая в другую емкость, утрачивает способность свертываться.

*Консервированную кровь* получают, вводя консервант в свежесобранную либо в дефибринированную кровь.

Для приготовления *взвеси эритроцитов* дефибринированную кровь фильтруют через трехслойный марлевый фильтр. Фильтрат наливают в центрифужные пробирки и центрифугируют при 2000-3000 об/мин в течение 10-15 мин. Эритроциты оседают на дно пробирки, а прозрачная, слегка желтоватого цвета плазма образует надосадочный слой. После центрифугирования плазму удаляют, а эритроциты 2-3 раза промывают стерильным изотоническим раствором хлористого натрия. Из промытых эритроцитов готовят взвесь необходимой концентрации.

#### ***2.5.2.4. Приготовление диагностических препаратов с использованием плазмы и сыворотки крови животных-продуцентов***

Помимо цельной крови и эритроцитарной взвеси в диагностических исследованиях могут быть использованы также плазма и сыворотка крови животных-продуцентов, как интактных, так и предварительно иммунизированных.

Для определения родовой, видовой и типовой принадлежности антигена необходимы заведомо известные иммунные диагностические сыворотки. Их получают путем многократного введения животным-продуцентам нарастающих доз убитых или живых микроорганизмов, или продуктов их распада, или обезвреженных или нативных токсинов. В качестве продуцентов чаще всего используются кролики и морские свинки, а кроме них также куры, козы (козлы), овцы (бараны-валухи), коровы (волы), лошади, ослы.

На активность выработки антител влияют тип нервной деятельности животного-продуцента, реактивность организма, порода, пол, конституция, возраст.

Кроликов и морских свинок используют при достижении ими половозрелого возраста, овец (баранов и валухов) – в возрасте 2-3 лет и массой 30-45 кг, свиней – крупной белой породы в возрасте 5-6 месяцев и массой не менее 80 кг, волов – симментальской, швицкой пород в возрасте от 3 до 8 лет, массой не менее 350 кг, лошадей используют в возрасте от 3 до 12 лет, как правило, помеси донской и казахской пород.

При гипериммунизации получают неадсорбированные и адсорбированные диагностические сыворотки. Неадсорбированные сыворотки обладают высокими титрами антител, но способны давать групповые (перекрестные) реакции, тогда как адсорбированные сыворотки отличаются строгой специфичностью действия (реагируют только с гомологичным антигеном).

Приготовление диагностических сывороток, в принципе, не отличается от приготовления лечебно-профилактических сывороток и вакцин, т.е. в процессе производства диагностических специфических сывороток, диагностикумов и аллергенов используются те же технологические приемы, что и при производстве лечебно-профилактических препаратов. Однако разнообразие номенклатуры выпускаемых диагностических препаратов, специфика их обработки, подчас очень кропотливой, приготовление монорецепторных сывороток, необходимость внедрения физико-химических методов очистки обуславливают выделение производства этих препаратов в специальные отделения.

К числу иммунных сывороток, чаще всего используемых в КЛД для обнаружения антигенов или для идентификации микроорганизмов относятся:

- агглютинирующие,
- преципитирующие,
- лизирующие (комплементсвязывающие),
- нейтрализующие (антитоксические),
- флуоресцирующие.

При этом их также подразделяют на:

- моновалентные (содержат антитела против 1 антигена);
- поливалентные (содержат антитела против нескольких антигенов);
- видовые (для идентификации микроорганизмов до вида);
- групповые (для определения серогруппы микроорганизма);
- серовариантные (для определения сероварианта микроорганизма).

*Агглютинирующие сыворотки* готовят путём гипериммунизации животных корпускулярными антигенами. Для иммунизации животных можно применять живые и убитые культуры, являющиеся типичными по своим морфологическим, культуральным, биохимическим, серологическим и антигенным свойствам. В связи с непостоянным содержанием антигенных компонентов у одного и того же вида бактерий, желательно животных иммунизировать несколькими штаммами (2-3) этого вида микроба. Для получения поливалентных агглютинирующих сывороток прибегают к одновременному введению смеси антигенов из нескольких типов бактерий одного и того же вида.

В качестве антигенов используют культуры бактерий в S-форме, а в качестве иммунизируемых животных – чаще всего кроликов. Лучшие результаты получаются при применении формализированных и обработанных парами формалина микробных взвесей.

Иммунизацию проводят путем введения антигена в краевую ушную вену, в двукратно нарастающих дозах. Для получения полноценных сывороток обычно бывает достаточно 3-4 инъекций с интервалами в 4-5 суток. На 5-7 день после

третьей инъекции берется проба крови и проверяется титр сыворотки. При получении недостаточного титра кролику вводят еще одну дозу, аналогичную предыдущей или удвоенную в зависимости от веса и состояния животного. В итоге весь цикл иммунизации может длиться около месяца.

Если титр сыворотки удовлетворителен, у кролика отбирают кровь одним из трех способов – из ушной вены, или из сердца, или из сонной артерии (при тотальном кровопускании).

Диагностические агглютинирующие сыворотки готовятся к лептоспирам, листериям, бруцеллам, кампилобактериям, эшерихиям, сальмонеллам и другим микроорганизмам, эти сыворотки используют в различных вариантах реакции агглютинации. Технология их изготовления однотипна и будет рассмотрена в следующем подразделе на примере производства сывороток, используемых при диагностике кишечных инфекций.

*Преципитирующие сыворотки*, как и агглютинирующие, получают путем иммунизации продуцентов живыми или убитыми микробами, а также разнообразными лизатами и экстрактами микробных клеток. Их можно получить к любому чужеродному белку растительного и животного происхождения, а также к гаптенам при иммунизации животного полноценным антигеном, содержащим данный гаптен.

Получение преципитирующих сывороток от агглютинирующих отличается тем, что титры сывороток для реакции преципитации должны быть не ниже 1:100000, а это требует более длительной иммунизации продуцентов. Так, при производстве сибиреязвенной преципитирующей сыворотки продуцентам (лошадям) вначале вводятся небольшие дозы (по 0,5 мл) антигена в течение двух-трех недель по 3 дня подряд с перерывом в четыре дня. Более массивные дозы (1-2-3 мл) вводятся по 8-12-16 раз с интервалами в четыре-шесть дней. Эффективность иммунизации повышает ее разделение на два цикла – один из 6-8 внутривенных инъекций по 1-2 мл, а другой – 6-8 внутрибрюшинных инъекций по 3-5 мл. Кровь отбирается на восьмой-двенадцатый день после последнего введения антигена.



Чаще всего преципитирующие сыворотки применяют для проверки коже-  
венного сырья на сибирскую язву (реакция Асколи), а также при исследовании  
на сибирскую язву патологического материала, особенно из загнивших трупов.  
Преципитирующие диагностические сыворотки применяют, кроме того, для ди-  
агностики бруцеллёза, ящура, бешенства, лейкоза, инфекционной анемии и др.  
Технологический принцип приготовления их такой же, как и преципитирующих  
сибиреязвенных сывороток, но в качестве доноров чаще всего используют кро-  
ликов, а реакция преципитации ставится с ними в варианте диффузной преципи-  
тации.

*Диагностические сыворотки для постановки реакции связывания компле-  
мента* которую чаще всего применяют для диагностики бруцеллеза, ящура, сапа,  
кампилобактериоза, гриппа, ньюкаслской болезни, обычно получают от морских  
свинок. Так, комплементсвязывающую сыворотку для диагностики ящура полу-  
чают от морских свинок, которым вводят слабовирулентный вирус, адаптирован-  
ный к организму новорождённых крольчат или к культурам клеток и спустя 30-  
40 суток дополнительно гипериммунизируют тем же материалом путём двух-че-  
тырёх внутримышечных инъекций. Через 7-10 суток после последней инъекции  
морских свинок обескровливают и из крови готовят инактивированную сыво-  
ротку, которую затем проверяют в РСК на активность и специфичность.

*Гемолитические сыворотки* получают путем гипериммунизации кроликов  
отмытыми эритроцитами барана с интервалами в 48 часов. Каждый кролик полу-  
чает в ушную вену 4 инъекции бараньих эритроцитов в повышающейся концен-  
трации:

- 1 инъекция-3 мл 25 % взвеси бараньих эритроцитов,
- 2 инъекция-3 мл 50 % взвеси бараньих эритроцитов,
- 3 инъекция-3 мл 75 % взвеси бараньих эритроцитов,
- 4 инъекция-3 мл 75 % взвеси бараньих эритроцитов.

Через 6 дней после последней инъекции у кроликов берется кровь из уш-  
ной вены в два приема с интервалом в один день в количестве 60-80 мл. Кровь  
оставляется при комнатной температуре на 1-2 ч, затем при температуре 3-6 °С

на 20-24 ч. На следующий день сыворотку отсасывают после центрифугирования в стерильную колбу.

*Диагностические антивирусные сыворотки* используются чаще всего в постановке реакций связывания комплемента, нейтрализации вируса и реакции торможения гемагглютинации. Они готовятся так же, как и антибактериальные. Получают их, используя виды продуцентов, восприимчивых к соответствующему вирусу. Для иммунизации используются живые или инактивированные вирусные культуры.

*Антитоксические диагностические сыворотки* чаще всего готовят для диагностики инфекций, возбудители которых образуют экзотоксины. Типичным примером является изготовление антитоксических сывороток к *C. perfringens* типов А, С, D, Е и F. Их продуцентами чаще всего являются валухи тонкорунных пород в возрасте двух лет. Для иммунизации используют очищенные и концентрированные анатоксины, полученные от соответствующих типов *C. perfringens*. Для каждого типа используют отдельных продуцентов. Антигены вводят подкожно в возрастающих дозах с интервалом 4-6 суток между инъекциями до тех пор, пока титр антитоксинов не достигнет заданного уровня. Активность каждого типа антитоксических сывороток устанавливают в реакции нейтрализации специфических токсинов при введении их смесей белым мышам или крысам.

*Люминесцирующие (флюоресцирующие) сыворотки* обычно готовят из кроличьих иммунных сывороток, которые получают аналогично агглютинирующим и преципитирующим сывороткам. Кроликов иммунизируют многократно инактивированными антигенами и получают сыворотку крови с титром антител не ниже 1:6400-1:12800. Из сыворотки извлекают глобулиновую фракцию методом высаливания сернокислым аммонием, освобождают от сульфата аммония диализом против физиологического раствора и обрабатывают глобулин флюорохромом (изоцианатом флюоресцеина или изотиоцианатом флюоресцеина) в соотношении 3 мг красителя на 100 мг белка и консервируют мертиолятом.

#### 2.5.2.4.1. Производство диагностических сывороток и бактериальных диагностикумов для реакции агглютинации

Как уже указано в подразделе 2.2.1.1, РА используется и для идентификации (дифференциации) патогенов, выделенных из исследуемых образцов, и для выявления в исследуемом материале антител к этим патогенам. Идентификация патогенов в исследуемых образцах выполняется с использованием *диагностических сывороток*, содержащих соответствующие антитела, а выявление в образцах специфических антител проводится с использованием *диагностикумов*, представляющих либо взвеси инактивированных клеток соответствующих микроорганизмов, либо высокодисперсную суспензию каких-либо частиц, на поверхности которых сорбированы соответствующие антигены.

Технологический процесс получения диагностических сывороток можно рассмотреть на примере технологии производства сывороток для идентификации возбудителей кишечных инфекций. Она складывается из получения антигенов для иммунизации продуцентов, иммунизации продуцентов, забора крови у иммунизированных продуцентов и ее соответствующей обработки. Перечни технологических стадий и составляющих эти стадии операций такого процесса даны в табл. 8.

Таблица 8.

#### Перечни стадий и операций получения диагностических сывороток для дифференциации (идентификации) бактерий

№ стадии	Наименование стадии	№ операции	Наименование операции
ВР-1.	Подготовка производства	ВР-1-1	Подготовка помещений и оборудования
		ВР-1-2	Водоподготовка
		ВР-1-3	Подготовка лабораторной посуды для микробиологических исследований
		ВР-1-4	Подготовка питательных сред
		ВР-1-5	Подготовка персонала

ВР-2.	Входной контроль сырья и материалов		
ТП-3.	Получение антигенов	ТП-3-1	Поддержание музейных культур производственных штаммов
		ТП-3-2	Получение рабочих посевных (маточных) культур
		ТП-3-3	Получение биомассы производственных штаммов
		ТП-3-4	Приготовление антигенов
		ТП-3-5	Приготовление микробных адсорбентов
		ТП-3-6	Приготовление диагностикумов
		ВР-3-7	Обработка отходов
ТП-4.	Иммунизация продуцентов и получение сывороток и иммуноглобулинов	ТП-4-1	Подготовка антигенов для иммунизации
		ТП-4-2	Подготовка продуцентов
		ТП-4-3	Иммунизация продуцентов
		ТП-4-4	Пробное кровопускание и оценка титра видоспецифических антител в крови
		ТП-4-5	Производственное кровопускание
		ТП-4-6	Получение нативных сывороток
		ТП-4-7	Сведение нативных сывороток в серии
		ТП-4-8	Адсорбция сывороток (удаление гетерологичных антител)
		ТП-4-9	Стерилизующая фильтрация адсорбированных сывороток
		ТП-4-10	Получение иммуноглобулинов

		ТП-4-11	Разведение, розлив, лиофилизация, укупорка и маркировка сывороток и иммуноглобулинов
		ТП-4-12	Контроль качества готовых реагентов
		ТП-4-13	Хранение до комплектации набора
		ВР-4-14	Обработка отходов
ТП-5.	Комплектация, упаковка, маркировка		
ТП-6.	Приемочный контроль набора и передача на склад готовой продукции		

При подготовке производства (стадия ВР-1), помимо указанного в разделе 2.5.1, необходимо учесть следующее.

В комплект технологической документации обязательно должна входить СОП «Подготовка лабораторной посуды для микробиологических исследований». Применительно к приведенному в табл. 8 перечню технологических операций эта СОП описывает операцию ВР-1-3, и о ней необходимо сказать несколько подробнее.

Лабораторная посуда – это специализированные ёмкости различного конструктивного исполнения и объёма, изготовленные из разнообразных материалов, устойчивых к агрессивным средам и обладающие необходимой термостойкостью, прозрачностью и другими нужными физическими свойствами.

Для мытья микробиологической лабораторной посуды необходимо применять нейтральные моющие средства, жидкое мыло. Допустимо также использовать с этой целью нейтральные синтетические моющие средства, не содержащие биодобавок.

Новую посуду, предназначенную для микробиологической работы, моют в 0,5%-ном растворе моющего средства, ополаскивают проточной водопроводной

водой, затем ополаскивают очищенной водой, полученной из водоустановки (например, УВОИ-«М-Ф»).

Контроль чистоты мытья лабораторной посуды для микробиологического анализа осуществляют путём визуального наблюдения и выборочного проведения тестов. Стекло вымытой и высушенной посуды должно быть прозрачным, без подтеков, пятен и посторонних включений. При ополаскивании вымытой посуды вода стекает равномерно со стенок флаконов, пробирок и пр. Сушат вымытую посуду при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре 110 °С 30 минут.

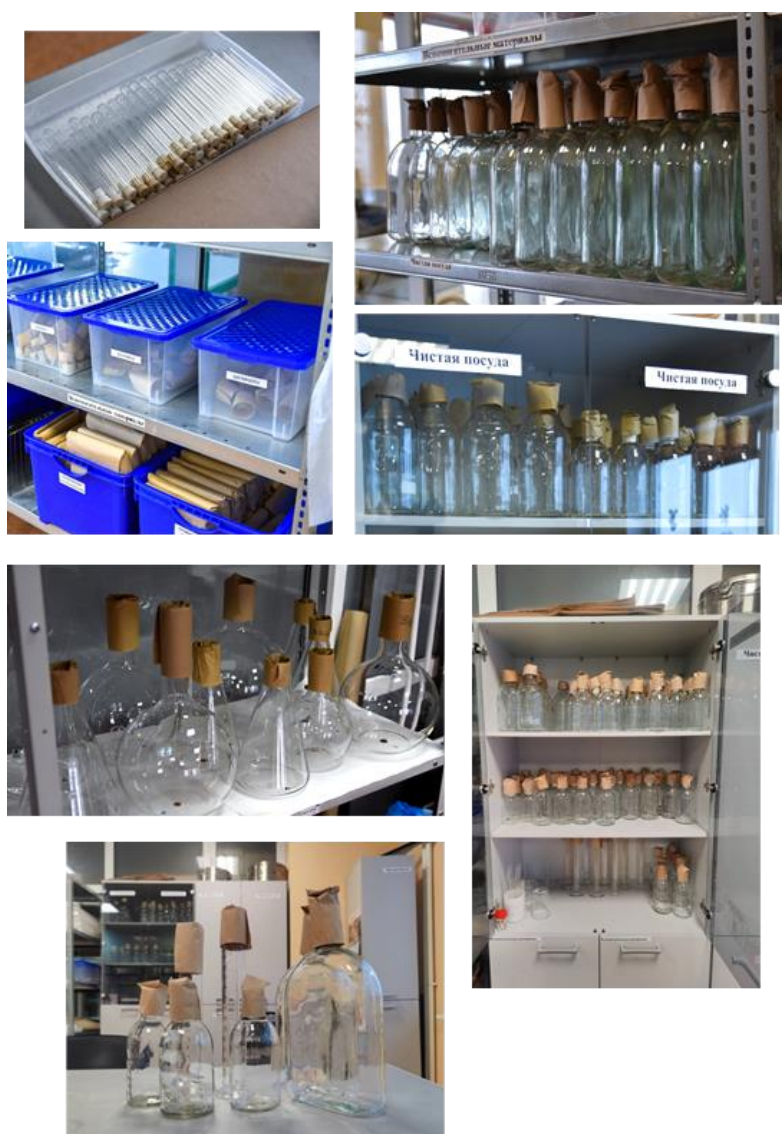


Рис. 89. Основные виды лабораторной посуды, используемой в технологическом процессе получения микробной биомассы.

После окончания сушки вся лабораторная посуда монтируется – бактериологические пробирки и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, состоящими из плотно скрученных валиков ваты, покрытых слоем марли, пробирки заворачивают в бумагу по 15-20 штук, флаконы и цилиндры закрываются сверху колпачками из крафт-бумаги. При монтаже пипеток в верхний конец вставляют небольшой кусочек ваты. У пипеток Пастера должен быть запаян капилляр. Каждую мерную пипетку заворачивают длинной полоской бумаги шириной 4-5 см, начиная с носика, винтообразно по всей длине. Пипетки Пастера заворачивают в бумагу по 10-20 штук. Все виды пипеток желательно хранить до и после стерилизации в специальных металлических пеналах. Пробки на колбах дополнительно покрывают колпачками из бумаги.

Перед дальнейшим использованием посуды её необходимо простерилизовать. Посуду размещают в сушильном шкафу не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха, и следят, чтобы температура не превышала 180 °С, так как при более высокой температуре бумага и вата будут обугливаться. Для контроля правильного проведения стерилизации используются индикаторы. После окончания стерилизации сушильный шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нём не снизится до 70-80 °С, поскольку резкий перепад температур может привести к разрушению стекла.

Поскольку во всех биотехнологических производствах качество выпускаемого продукта в значительной степени определяется качеством воды, используемой в технологическом процессе, особое внимание следует уделять ее подготовке, которую должна регламентировать инструкция по эксплуатации установки для получения воды очищенной» (например, «Медиана-Фильтр», см. рис. 90).



Рис. 90. Установка для получения воды очищенной УВОИ-«М-Ф»

Отдельными операциями выделены также подготовка питательных сред, необходимых в процессе получения бактериальных антигенов, и подготовка персонала. Поскольку и то, и другое – это необходимые элементы подготовки производства, правила их проведения должны быть регламентированы специальными СОПами.

В подготовку производства, в принципе входит также подготовка сырья и материалов, но, поскольку она должна начинаться с определения пригодности наличного сырья и материалов для производства конечного продукта, т.е. со входного контроля, последний выделен в отдельную стадию (ВР-2). Его правила и порядок должен определять специальный документ, в нашем случае – это «Положение о входном контроле», общее для всего производства диагностических препаратов. Входному контролю подвергаются все закупные реактивы и материалы, используемые в производстве.

Следующей стадией процесса производства диагностических сывороток является получение антигенов, необходимых для иммунизации животных-проду-



центров, бактериальных сорбентов для удаления гетерологичных антител и диагностикумов для контроля специфической активности сывороток (ТП-3) (см. рис. 91 и 92).

Бактериальные диагностикумы для оценки с помощью РА наличия в исследуемых образцах видоспецифических антител к соответствующим микроорганизмам готовят из культур производственных штаммов этих микроорганизмов. Типовая технологическая схема их производства (рис. 91) включает получение биомассы соответствующего штамма, ее обработку, розлив, упаковку, маркировку, контроль качества полученного диагностикума и его хранение до комплектации набора.

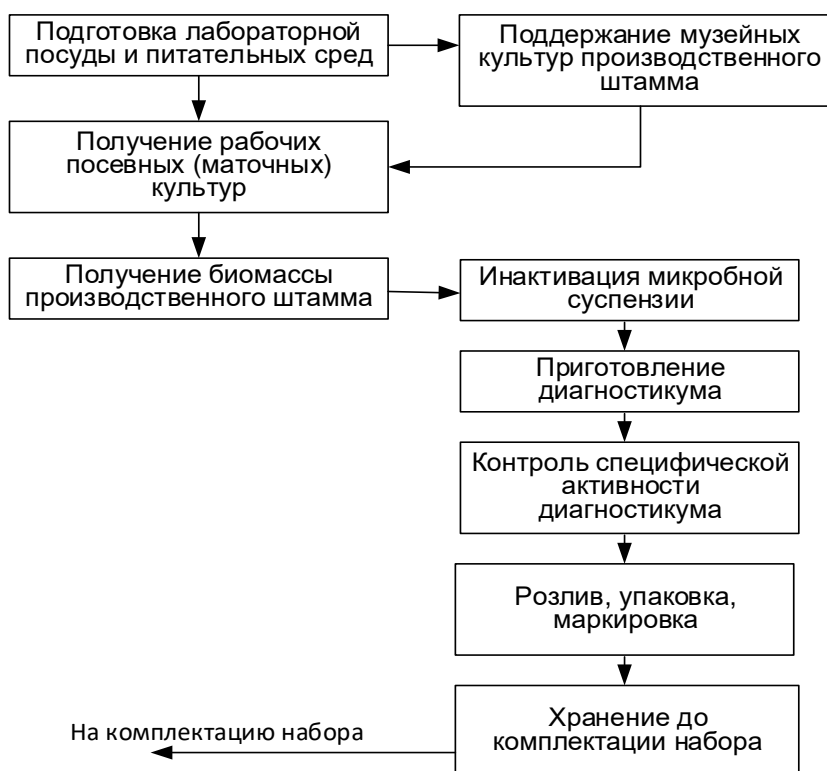


Рис. 91. Типовая схема получения бактериальных диагностикумов для РА.

Технология приготовления диагностикума и его контроля, очевидно, определяется особенностями микроорганизма и необходимостью максимального сохранения антигенов, определяющих его видоспецифичность.

Все эти работы выполняют с соблюдением требований асептики в боксах ламинарных шкафов. В число этих работ входит, прежде всего, поддержание музейных культур производственных штаммов, которые являются, по сути, исходными эталонами для получения рабочих культур, необходимых для наработки биомассы, используемой уже для получения антигенов для иммунизации животных-продуцентов, бактериальных сорбентов (для удаления гетерологичных антител) и диагностикумов (для контроля специфической активности сывороток).

В качестве примера можно рассмотреть технологический процесс получения антигенов, микробных адсорбентов и диагностикумов *E.coli* (см. рис. 86).

Музейные культуры производственных штаммов *E.coli* хранят при 2-8 °С в лиофилизированном виде, или при минус 70-80 °С в замороженном (в криопробирках) виде, или на специальной питательной среде (среде Дорсе)<sup>15</sup> при 2-8 °С.

Все эти культуры периодически пассируют. При этом для пассирования лиофилизированных культур обрабатывают ампулу с сухой культурой спиртом, дают ей высохнуть. Стебель ампулы помещают в пламя спиртовки, нагревают до красного цвета. Кусочком стерильной ваты, смоченным стерильной водой, касаются нагретой части ампулы для получения трещины. Осторожно отламывают конец ампулы с помощью пинцета. Стерильной пипеткой вносят в ампулу 1 мл стерильного питательного бульона, растворяют таблетку. Переносят содержимое ампулы в пробирку с питательным бульоном, помещают пробирку в термостат при 37° С на 4-6 ч, после чего пересевают культуру с бульона на чашку Петри с подготовленным агаром, чашку помещают в термостат при 37° С на 18-20 ч.

Для пассирования замороженных культур криопробирку обрабатывают снаружи дезсредством. Через 1,5 мин открывают криопробирку, прокалённым пинцетом или петлёй переносят 2 «бусины» в пробирку с питательным бульоном. Помещают пробирку с посевом в термостат при 37°С на 4-6 ч (криопробирку сразу же после посева возвращают в морозильник), после чего делают пересев

---

<sup>15</sup> При работе с возбудителями иных инфекций питательные среды могут быть иными.

культуры с бульона на чашку Петри с подготовленным агаром, чашку помещают в термостат при 37° С на 18-20 ч.

Для пассирования культур, хранящихся на среде Дорсе, прокаленной бактериологической петлей пересевают культуру со среды Дорсе в пробирку с питательным бульоном. Помещают пробирку с посевом в термостат при 37°С на 4-6 ч, после чего пересевают культуру с бульона на чашку Петри с подготовленным агаром, чашку помещают в термостат при 37° С на 18-20 ч.

Полученные при всех этих операциях культуры на чашках Петри используют для получения чистых культур производственных штаммов и контроля их специфичности. Для чего выросшие на чашках Петри колонии просматривают в косопадающем свете в микроскопе МБС-1. Детально просматривая все выросшие колонии, выявляют цвет, форму и структуру их поверхности. Отбирают несколько колоний в S-форме и проверяют отобранные колонии в развёрнутой реакции агглютинации в пробирках с соответствующей диагностической сывороткой. По результатам развёрнутой реакции агглютинации, субкультуры, давшие агглютинацию с более высокими разведениями сыворотки, высевают на чашки с агаром и повторяют опыт в том же порядке. 2-3 пассажа с отбором колоний, более богатых необходимым антигеном, повышают специфическую агглютинабельность всей популяции.

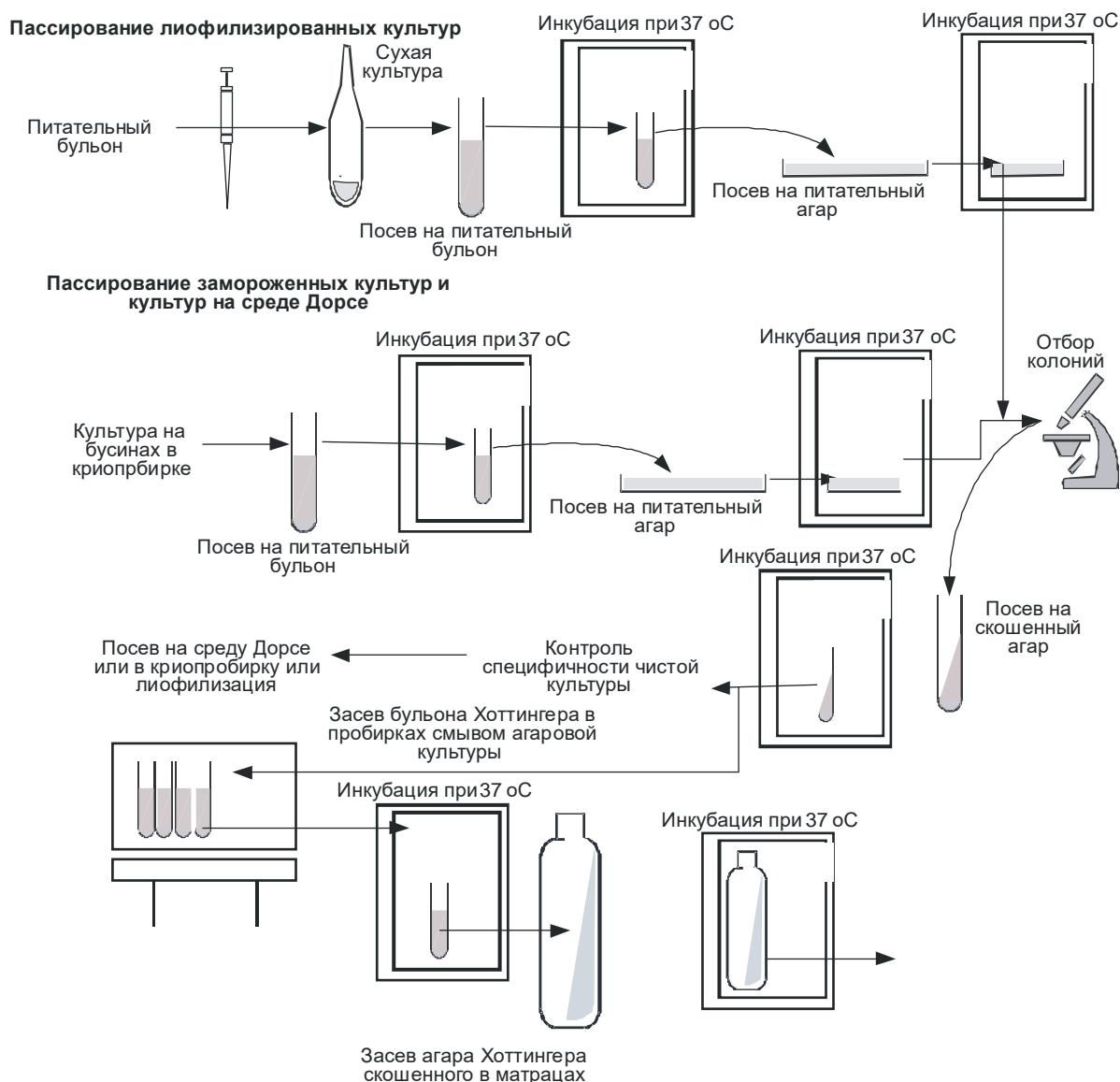


Рис. 92. Аппаратурная схема получения бактериальной биомассы *E.coli* для приготовления антигенов, микробных адсорбентов и диагностикумов

Последние пассажи отобранных культур используют для обновления музейных культур, для чего пересевают их для хранения на среду Дорсе, помещают на бусах в криопробирку или лиофилизируют.

Музейные культуры на среде Дорсе используют также для получения рабочих посевных (маточных) культур. Для чего прокаленной петлей пересевают культуру со среды Дорсе в пробирку с питательным агаром. Помещают пробирку с посевом в термостат при 37°С на 18-20 ч., после чего производят пересев выросшей культуры на питательный бульон. Инкубируют 4-6 ч при температуре 37°С.

Полученные бульонные культуры используют как маточные при наработке биомассы производственных штаммов, засевая ими матрацы со скошенным агаром, для чего смачивают внесенной культурой всю поверхность питательного агара, скошенного в матрацах. Засеянные матрацы помещают в термостат агаром вверх. Инкубация 18-20 ч при 37°C.

Визуально контролируют характер роста на скошенном агаре и наличие колоний посторонней микрофлоры. Матрацы, на которых обнаружены колонии посторонних микробов, отбраковывают. Микробную массу смывают стерильным физраствором.

Смывы одноимённых культур объединяют в стерильных бутылках и используют для приготовления антигенов, для чего бактериальную взвесь стерилизуют (либо формализуют, либо прогревают при 100 °С, либо обрабатывают ацетоном или спиртом).

Стерильные бактериальные взвеси стандартизируют, доводя их концентрацию до 100 млрд. микробных тел в 1 мл, и контролируют их стерильность, для чего по 0,1 мл каждой антигенной взвеси вносят в 4 пробирки с тиогликолевой средой. Посевы инкубируют не менее 14 сут. при двух температурных режимах – 30-35 °С и 20-25 °С. При отсутствии микробиологического роста взвеси пригодны к использованию. Нестерильные взвеси уничтожают. Стерильные стандартизованные взвеси хранят до использования при температуре 2-8 °С – «ацетоновые» до 6 мес., формализованные и «гретые» – до 2 мес.

Стерильные стандартизованные микробные взвеси используются далее в качестве антигенов для иммунизации животных-продуцентов, адсорбентов гетерологичных антител и диагностикумов для контроля специфической активности сывороток (в качестве последних используют «гретые» микробные взвеси

На следующей стадии (ТП-4) в процесс включаются манипуляции с животными-продуцентами, в качестве которых чаще всего используются кролики, но это могут быть и бараны, и крупный рогатый скот, и лошади. Основные правила работы с ними уже изложены в подразделе 2.5.2.1 настоящего пособия. Стадия начинается с подготовки антигенов и продуцентов для иммунизации (см. рис. 93).

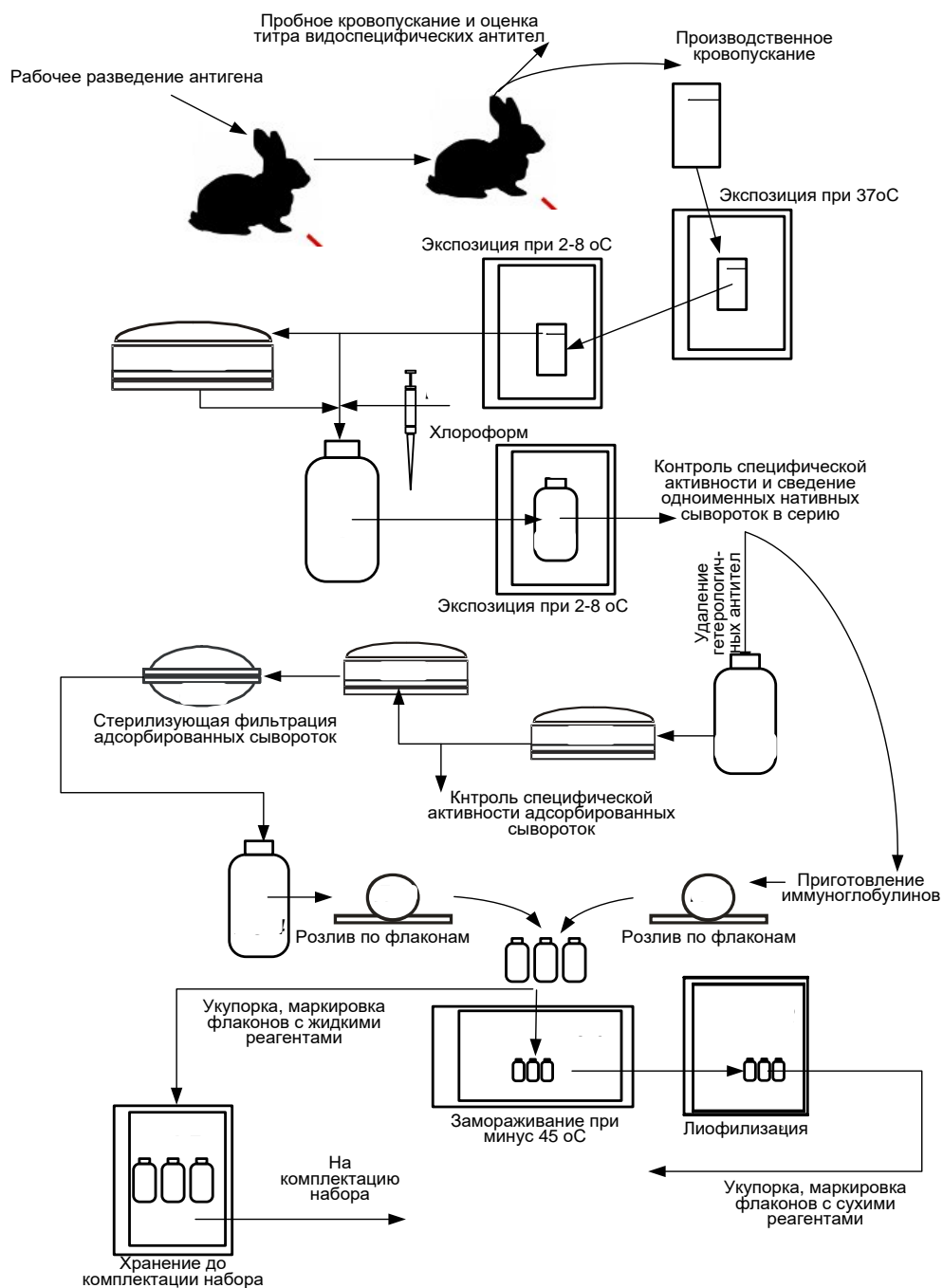


Рис. 93. Схема получения сывороток диагностических

Рабочие разведения антигенов готовят, разводя стандартизованные бактериальные взвеси стерильным физиологическим раствором до концентрации  $10^9$  микробных клеток/мл по стандарту мутности.

Подбирают необходимое число животных-продуцентов, для этого виварщик осматривает их, отбраковывая вялых, малоподвижных, с видимыми выделе-

ниями из глаз, дыхательных путей, с диспептическими расстройствами, с кожными поражениями и т.п. особей. При клеточном содержании на каждую клетку прикрепляют бирку, на которой указывают № партии продуцентов, вид антигена, дату начала иммунизации, при свободном содержании каждого продуцента чипируют.



Рис. 94. Помещение для содержания кроликов.

Аналогично тому, что в практике профилактической вакцинации нет универсального метода введения вакцины, и поэтому используется несколько способов вакцинации - подкожный, внутримышечный, энтеральный, аэрозольный, безыгольный, при иммунизации продуцентов также могут быть использованы различные способы введения антигенов.

При выборе способа введения необходимо учитывать его простоту и производительность, а также интенсивность болевых ощущений, испытываемых животным. Кроме того, для организации производства диагностических сывороток могут оказаться существенными особенности тех инфекций, возбудители которых подлежат идентификации. Так, может оказаться существенным соотношение клеточного и гуморального иммунитета в процессе взаимодействия конкретного

возбудителя с организмом хозяина, о чем можно судить по ранговым интенсивности проявления обоих типов иммунитета, приведенным в монографии Н.В Медуницына «Вакцинология» [4] (см. табл. 9)

Хотя оценки, приведенные в табл. 9, относятся к уровню защищенности человека при соответствующих инфекциях и инвазиях, они могут оказаться полезными и при выборе метода иммунизации животных-продуцентов.

Таблица 9.

Участие двух типов иммунитета в развитии защиты при инфекционных и паразитарных заболеваниях (по [36])

Инфекции	Клеточный иммунитет	Гуморальный иммунитет
Герпес	+	+
Краснуха	±	+++
Бешенство	±	++
Ветряная оспа	±	+++
Натуральная оспа	+	+++
Клещевой энцефалит	±	+++
Полиомиелит	±	+++
Гепатит А	±	++
Гепатит В	+	++
Грипп	+	+
Паротит	+	+++
Корь	+	+++
Столбняк	+	++
Дифтерия	+	++
Коклюш	++	+
Ботулизм	±	+
Газовая гангрена	±	+
Клебсиеллез	±	±
Стафилококковая инфекция	+	+
Стрептококковая инфекция	±	+
Пневмококковая инфекция	+	+
Менингококковая инфекция	±	++
Холера	±	++
Дизентерия	±	++



Сальмонеллез	+	++
Сифилис	+	+
Туберкулез	+++	±
Листерия	++	+
Туляремия	+++	+
Бруцеллез	+++	±
Лепра	+++	-
Чума	++	++
Криптококкоз	+	±
Бластомикоз	+	±
Гистоплазмоз	+	±
Кокцидиоидомикоз	++	±
Кандидоз	++	±
Малярия	±	+
Амебиаз	±	±
Лейшманиоз	+	±
Трипаносомоз	±	+
Токсоплазмоз	+	±
Аскаридоз	±	+
Эхинококкоз	±	+
Шистосомоз	±	+
Трихинеллез	+	±
Филяриатоз	+	±
Риккетсиоз	±	+
Коксиеллез	+	±

Кроликов иммунизируют, вводя в краевую вену уха рабочее разведение антигена по следующей схеме: 0,2 мл – 0,5 мл – 1,0 мл – 2,0 мл – 4,0 мл – 6,0 мл, с 4-суточным интервалами между инъекциями (итоговая иммунизирующая доза 13,7 мл). Ухо кролика обрабатывают спиртом, асептически шприцем вводят необходимую дозу рабочего разведения антигена.

Через 6 сут. после последней инъекции антигена для контроля специфической активности сыворотки (оценки титра антител) отбирают в стерильную бактериологическую пробирку 2-3 мл крови (пробное кровопускание). Пробирки маркируют. После свёртывания кровь оставляют на 1 ч в термостате при 37°C, отделяют полученные сыворотки от сгустков крови и определяют их специфическую активность в развернутой РА в пробирках.

При контроле сывороток продуцентов, иммунизированных поливалентными антигенами, специфическую активность оценивают в РА на стекле.

Активность О-групповых и факторных сывороток проверяют в РА на стекле с гомологичным диагностикумом. Учёт реакции проводят через 3 мин, должен быть получен мелкозернистый агглютинат.

По результатам контроля отбирают продуцентов, в сыворотке крови которых содержатся специфические антитела в титре не ниже заданного. У них через 7 сут. после последней иммунизации забирают кровь (производственное кровопускание) в три приема – два частичных с интервалом в 1 сут. и полное – на следующие сутки после второго частичного. При частичном кровопускании забирают 35-40 мл крови из краевой вены уха, вводя после каждого забора подкожно по 30-40 мл подогретого до 38 °С стерильного физиологического раствора. При тотальном кровопускании кровь забирают из сонной артерии, получая от одного кролика 80-100 мл крови. Кровь забирают в асептических условиях в стерильные цилиндры, смоченные стерильным физиологическим раствором.

Сосуды с кровью выдерживают 1 ч при 37 °С для формирования сгустка, а затем 20-24 ч при 2-8 °С для отделения сгустка от сыворотки. Прозрачную часть полученной сыворотки сливают в стерильные флаконы, мутную часть центрифугируют, полученный супернатант объединяют с прозрачной частью сыворотки. Вносят в сыворотки хлороформ (для консервации) и выдерживают сыворотки с хлороформом не менее 2 мес. для стабилизации белков и снижения титра гетерологичных антител.

Одноименные сыворотки, полученные из различных порций крови и от разных кроликов, объединяются в серии, для чего вначале готовят пробные смеси одноименных сывороток. Оценивают специфическую активность пробных смесей в реакции агглютинации на стекле и в развернутой РА с гомологичными культурами, постановку РА выполняют в соответствии с инструкцией по применению набора.

Специфичность смесей ОК-сывороток определяют в ориентировочной РА на стекле и в развёрнутой РА. РА на стекле проводят с живыми гетерологичными культурами без разведения и в разведениях 1:3, 1:5, 1:10. Развёрнутую реакцию

агглютинации проводят с живыми культурами и культурами, убитыми прогреванием в течение 1 ч при 100°C.

Специфичность смесей поливалентных сывороток определяют в РА на стекле с гетерологичными штаммами.

Специфичность смесей О-сывороток определяют в РА на стекле с гретыми диагностикумами из гетерологичных О-групп.

Смеси считают пригодными для использования, если титр гетерологичных антител к каждому штамму, использованному для проверки специфичности сывороток, меньше половины титра специфических антител. В противном случае, т.е. если титр неспецифических антител более половины титра специфических антител, необходимо проверить специфичность всех сывороток, составляющих смесь и отбраковать сыворотки с низкой специфичностью.

Одноименные сыворотки, прошедшие контроль, сливают в одну стерильную бутылку и этой смеси присваивают номер новой серии.

Исходя из результатов оценки специфичности нативных сывороток, для каждой из них выбирают необходимые адсорбенты (стерильная биомасса гетерологичных вариантов). Адсорбцию ОК-сывороток проводят формализованными адсорбентами, адсорбцию О-сывороток - гретыми.

Готовят необходимые количества выбранных адсорбентов, исходя из расхода на 1 литр сыворотки смыва культуры соответствующего штамма с 5-10 матрасов.

Каждый адсорбент разводят в 2-3 мл стерильного физиологического раствора и вносят в емкость с соответствующей сывороткой.

Сыворотку с адсорбентом помещают на встряхиватель для жидкостей на 18 ч при комнатной температуре.

По завершении адсорбции сыворотку центрифугируют. В супернатанте проверяют специфическую активность и полноту адсорбции (титр гетерологичных антител).

Полноту адсорбции гетерологичных антител в поливалентных сыворотках определяют в РА на стекле с живыми гетерологичными штаммами эшерихий.

Полноту адсорбции ОК-эшерихиозных сывороток к отдельным серогруппам проверяют как в развёрнутой РА в пробирках с живыми и гретыми гетерологичными культурами, так и в РА на стекле в разведении 1:5 с живыми гетерологичными штаммами эшерихий.

Полноту адсорбции О-сывороток к отдельным серогруппам проверяют с применением гретых диагностикумов в РА на стекле.

Специфическую активность поливалентных сывороток после адсорбции проверяют в РА на стекле с живыми гомологичными культурами в разведениях.

Адсорбцию повторяют до полного освобождения сыворотки от гетерологичных антител.

Специфическую активность полностью освобождённых от гетерологичных антител ОК-сывороток проверяют в развёрнутой РА в пробирках с живыми и гретыми гомологичными культурами.

Специфическую активность полностью освобождённых от гетерологичных антител О-сывороток проверяют в реакции агглютинации на стекле с гретыми диагностикумами.

В адсорбированной сыворотке проверяют рН (должен быть 7,0-7,4, в противном случае сыворотка бракуется).

После адсорбции проводят фильтрацию сывороток с использованием стерилизующих фильтров. Перед фильтрацией сыворотки повторно центрифугируют для осаждения механических частиц и взвеси осадка денатурированного белка. Фильтрацию проводят в ламинарном шкафу в асептических условиях.

По окончании фильтрации контролируют рН сыворотки (должен быть 7,0-7,5, в противном случае сыворотка бракуется), специфическую активность и стерильность препарата.

Если в результате проверки выявлена нестерильность препаратов, допускается повторная фильтрация с последующим контролем стерильности.

Из нативных сывороток готовят также специфические иммуноглобулины, которые получают осаждением нативных сывороток 0,8% раствором риванола.

Конечный продукт представляет собой разведённую в 2 раза фракцию специфических иммуноглобулинов (преимущественно *IgG*) агглютинирующих сывороток. Контролируют специфическую активность и специфичность иммуноглобулинов, при необходимости проводят удаление гетерологичных антител согласно изложенной выше методике.

Завершающими стадиями технологического процесса являются фасовка сывороток и иммуноглобулинов, их укупорка и маркировка.

При выпуске лиофилизированных препаратов перед розливом, в сыворотки и иммуноглобулины, которые будут лиофилизированы, добавляют стерильный физиологический раствор и стерильную сахарозо-желатиновую среду, соблюдая условия асептики. В сыворотки и иммуноглобулины, которые оставляют жидкими, добавляют только стерильный физиологический раствор и натрия азид из расчёта 1 г на 1 литр разведённой сыворотки. При разведении необходимо учитывать результаты, полученные при контроле активности сыворотки после стерилизующей фильтрации, оставляя запас в одно разведение.

Розлив проводят в асептических условиях в шкафу ламинарного потока с помощью перистальтического насоса-дозатора.

Препараты, не подвергающиеся лиофилизации, разливают в подготовленные стерильные флаконы, изготовленные из нейтрального стекла. Флаконы закрывают стерильными крышками и маркируют.

Препараты, подвергающиеся лиофилизации, разливают в подготовленные стерильные флаконы, изготовленные из нейтрального стекла. Флаконы помещают на полки морозильной камеры при температуре минус 45°С не менее, чем на 24 ч. После чего переносят в камеру вакуум-сушильного аппарата и проводят лиофилизацию согласно заданному режиму.

Готовые реагенты контролируют на соответствие требованиям ТУ на набор и хранят до комплектации набора при 2-8 °С.

#### *2.5.2.4.2. Производство наборов реагентов для реакции пассивной гемагглютинации*

Как уже говорилось, для выявления в исследуемых образцах специфических антител помимо диагностикумов, представляющих инактивированные взвеси целых бактериальных клеток, могут использоваться диагностикумы, в которых антигены сорбированы на поверхности частиц высокодисперсной суспензии.

Первыми диагностикумами такого рода явились диагностикумы, в которых в качестве основы, «нагружаемой» антигенами использовались суспензии эритроцитов. Такие «нагруженные» или «сенсibilизированные» эритроциты в присутствии специфических антител дают РПГА, возможности визуального и автоматизированного контроля которой существенно повышаются за счет величины частиц, связываемых комплексами "антиген-антитело".

В комплект набора реагентов для РПГА помимо таких "нагруженных" или сенсibilизированных эритроцитов (тест-эритроцитов) обычно входят также эритроциты, не сенсibilизированные антигеном (контрольные эритроциты), контрольные образцы (образцы, заведомо содержащие и не содержащие соответствующий анализ) и неспецифические реагенты – буферные растворы для разведения исследуемых образцов (используются обычно при определении титра анализа в них).

Специфические особенности технологии производства таких наборов связаны, очевидно, с получением тест-эритроцитов (ТЭ) и контрольных эритроцитов (КЭ).

Типовая технологическая схема получения тест-эритроцитов (рис. 95) включает получение эритроцитарной взвеси и антигена для сенсibilизации эритроцитов, предварительную обработку эритроцитарной взвеси, ее сенсibilизацию, контроль качества полученного реагента, его фасовку укупорку и хранение до комплектации набора.

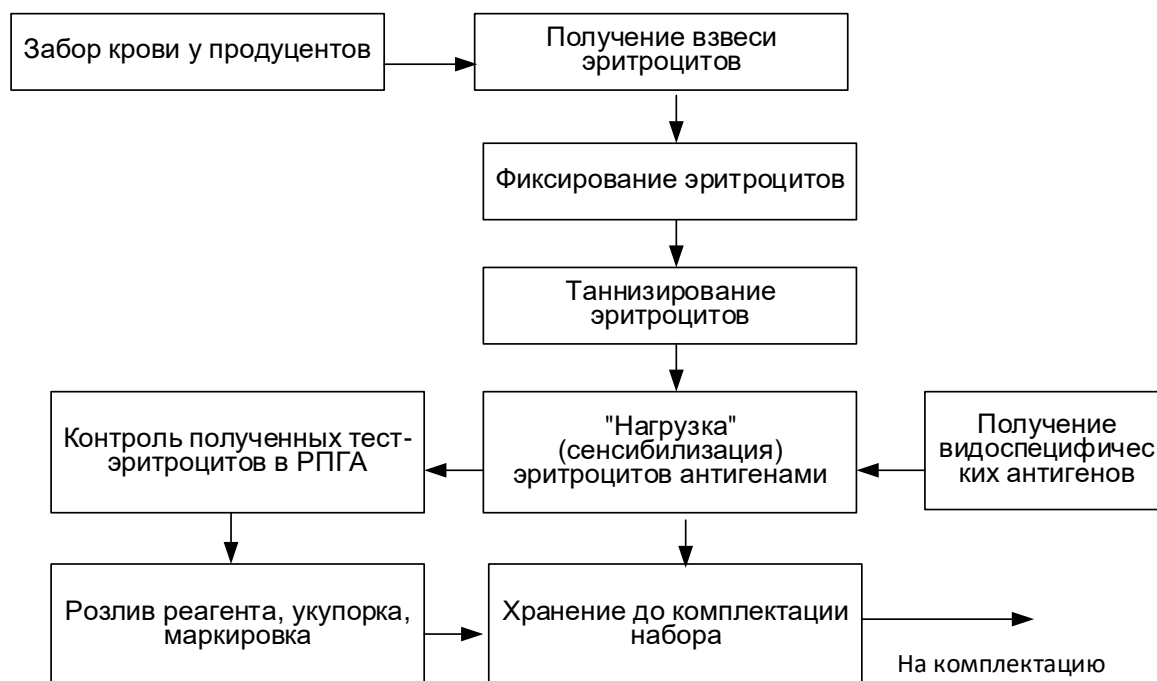


Рис. 95. Типовая схема получения тест-эритроцитов

Для приготовления эритроцитарной суспензии обычно используют баранью или птичью кровь. Отмывают эритроцитарную массу, подготавливают эритроциты для адсорбции на них антигенов, для чего фиксируют эритроциты формальдегидным или глутаральдегидным методом и таннизируют.

Параллельно подготовке эритроцитарной взвеси готовят антиген; соответствующий технологический процесс целиком определяется специфическими особенностями источника получения антигена. Так, получение нативных антигенов бактериальной природы включает получение биомассы соответствующего микроорганизма, лизис этой биомассы и, если необходимо, дополнительную обработку лизата физическими или физико-химическими методами.

При этом технологические детали приготовления ТЭ и КЭ для разных наборов, обрабатываемые в соответствующих экспериментальных исследованиях, могут значительно отличаться друг от друга, в чем несложно убедиться, сопоставив технологические процессы приготовления ТЭ и КЭ для таких наборов как "Сифилис-РПГА-тест" и "Vi-Сальмонелла-РПГА".

## 1. Приготовление вспомогательных растворов

### 1.1. Набор "Сифилис-РПГА-тест"

#### 1.1.1. Раствор Олсвера

Состав: глюкоза, натрий лимоннокислый 3-замещенный, натрий хлористый, вода очищенная.

#### 1.1.2. 25-кратный концентрат физиологического раствора хлористого натрия ( $\Phi P_{x25}$ )

Состав: натрий хлористый, вода очищенная.

#### 1.1.3. Физиологический раствор (изотонический раствор) хлористого натрия ( $\Phi P$ )

Состав: натрий хлористый или 25-кратный концентрат физиологического раствора, вода очищенная.

#### 1.1.4. 0,15 моль/л раствор натрия фосфорнокислого 1-замещенного 2-водного

Состав: натрий фосфорнокислый 1-замещенный 2-водный, вода очищенная.

#### 1.1.5. 0,15 моль/л раствор калия фосфорнокислого 2-замещенного

Состав: калий фосфорнокислый 2-замещенный, вода очищенная.

#### 1.1.6. Забуференный $\Phi P$ с рН 7,2 ( $З\Phi P_{7,2}$ )

Состав:  $\Phi P$ , 0,15 моль/л раствор натрия фосфорнокислого 1-замещенного 2-водного, 0,15 моль/л раствор калия фосфорнокислого 2-замещенного.

#### 1.1.7. 4% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА)

Состав: БСА,  $З\Phi P_{7,2}$ .

#### 1.1.8. 1 % раствор танина

Состав: танин, вода очищенная.

#### 1.1.9. 1 моль/л раствор гидроокиси натрия в $\Phi P$

Состав: гидроокись натрия,  $\Phi P$  .

#### 1.1.10. Формалин с рН 7,0-7,2

рН формалина доводится до 7,0-7,2 1 моль/л раствором натрия гидроокиси.



*1.1.11. 2 % нейтральный раствор формальдегида с 0,5 % глюкозы*

Состав: формалин (с концентрацией формальдегида 36 %, глюкоза, ЗФР<sub>7,2</sub>).

*1.1.12. 20% водный раствор азиды натрия*

*1.13. 1% спиртовой раствор фенолового красного*

### *1.2. Набор "Vi-Сальмонелла-РПГА"*

*1.2.1. 5-кратный концентрат раствора Олсвера (для консервации крови)*

Состав: глюкоза, натрий лимоннокислый 3-замещенный, лимонная кислота, натрий хлористый, вода очищенная.

*1.2.2. Раствор Олсвера*

Состав: 5-кратный концентрат раствора, вода очищенная.

*1.2.3. 25-кратный концентрат физиологического раствора хлористого натрия (ФР<sub>x25</sub>)*

Состав: натрий хлористый, вода очищенная.

*1.2.4. Физиологический раствор (изотонический раствор) хлористого натрия (ФР)*

Состав: натрий хлористый или 25-кратный концентрат физиологического раствора, вода очищенная

*1.2.5. 25-кратный концентрат забуференного ФР (ЗФР<sub>x25</sub>)*

Состав: натрий хлористый, натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный, калий фосфорнокислый 2-замещенный, вода очищенная .

*1.2.6. Забуференный ФР с рН 7,2 (ЗФР<sub>7,2</sub>)*

Состав: ЗФР<sub>x25</sub>, вода очищенная.

*1.2.7. ЗФР с 1% сыворотки (ЗФР<sub>-с 1%</sub>)*

Состав: сыворотка крови барана, ЗФР.

*1.2.8. ЗФР с 0,5% сыворотки (ЗФР<sub>-с 0,5%</sub>)*

Состав: ЗФР<sub>-с 1%</sub>, вода очищенная

*1.2.9. 10% водный раствор азиды натрия*

*1.2.10. 1% спиртовой раствор фенолового красного*

## 2. Получение эритроцитарной взвеси

### 2.1. Набор "Сифилис-РПГА-тест"

#### 2.1.1. Отбор крови

Используют кровь цыплят-бройлеров.

Кровь отбирают во время забоя бройлеров, вносят кровь в мерные флаконы с раствором Олсвера

#### 2.1.2. Отмывка эритроцитов от белков плазмы крови

Свежеотобранную кровь центрифугируют 15 мин при 1,5 тыс.об/мин, отсасывают плазму, эритроцитарный осадок через марлевый фильтр собирают в мерную емкость. При использовании хранившейся крови отсасывают плазму, эритроцитарный осадок через марлевый фильтр собирают в мерную емкость.

Собранную эритроцитарную массу разводят в 20 раз охлажденным до 5-10 °С ЗФР<sub>7,2</sub> и центрифугируют 15 мин при 1,5 тыс.об/мин. Супернатант сливают, эритроцитарный осадок переносят в чистый центрифужный стакан (на дне стакана после удаления эритроцитов может оставаться серая пленка – строма разрушенных эритроцитов, ее смывают ЗФР<sub>7,2</sub>), вновь разводят в 20 раз охлажденным до 5-10 °С ЗФР<sub>7,2</sub> и вновь центрифугируют 15 мин при 1,5 тыс.об/мин. Процедуру отмывки выполняют еще три раза, после чего отмывку эритроцитарную массу разводят 1:1 ЗФР<sub>7,2</sub> (50% взвесь).

#### 2.1.3. Обработка эритроцитов формалином

50 % взвесь эритроцитов разводят 2 % нейтральным раствором формалина с глюкозой в соотношении 1:7 и выдерживают 5 суток при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сливают, эритроцитарный осадок разводят ЗФР<sub>7,2</sub> в соотношении 1:1, полученную взвесь фильтруют через ватно-марлевый фильтр и выдерживают 3-4 суток при 2-8 °С до образования плотного осадка эритроцитов. Надосадочную жидкость сливают, эритроцитарную массу трижды промывают ЗФР<sub>7,2</sub> (осадок разводят ЗФР<sub>7,2</sub> в соотношении 1:20, центрифугируют 5 мин при 1500 тыс. об/мин). Осадок отмывших эритроцитов разводят ЗФР<sub>7,2</sub> в соотношении 1:1 (50 % взвесь формализированных эритроцитов).

#### 2.1.4. Таннизация эритроцитов

Проверяют стабильность формализированных эритроцитов (отсутствие спонтанной агглютинации), для чего из 50 % взвеси готовят 0,5 % взвесь в ФР; 0,1 мл такой взвеси вносят в лунку круглодонного планшета для иммунохимических исследований и наблюдают 40 мин. Если за это время эритроциты оседают на дно лунки в виде компактного пятна ("пуговки") с четко очерченным краем, спонтанная агглютинация отсутствует, формализированные эритроциты стабильны и пригодны для дальнейшего использования. В противном случае – при нестабильности эритроцитов они выпадают в осадок в виде рыхлого ровного слоя ("зонтика"), заполняющего дно лунки.

50 % взвесь стабильных формализированных эритроцитов разводят в 10 раз ЗФР<sub>7,2</sub>. В полученную 5 % взвесь вносят по каплям 1 % раствор таннина до его конечной концентрации 0,00005 %, взвесь выдерживают при постоянном перемешивании 30 мин при 37 °С, после чего дважды отмывают ЗФР<sub>7,2</sub>, для чего центрифугируют 5 мин при 1 тыс. об/мин, сливают супернатант, разводят осадок в 20 раз ЗФР<sub>7,2</sub>, вновь центрифугируют и проводят аналогичную отмывку уже ЗФР<sub>6,4</sub>.

#### 2.1.5. Приготовление КЭ

Осадок отмытых таннизированных эритроцитов разводят ЗФР<sub>7,2</sub> до получения 0,5 % взвеси, добавляют к ней 4 % раствор БСА до конечной его концентрации 0,2 %, 20 % раствор натрия азида до конечной его концентрации 0,2 % и выдерживают 2 суток при 2-8 °С

#### 2.1.6. Приготовление ТЭ

Осадок отмытых таннизированных эритроцитов разводят ЗФР<sub>6,4</sub> до получения 5 % взвеси. В 5 % взвесь таннизированных эритроцитов вносят рекомбинантный или лизатный антиген *Treponema pallidum*, выдерживают при постоянном перемешивании 40 мин при 37 °С, после чего трехкратно отмывают ЗФР<sub>7,2</sub> (режим отмывки см. п. 2.4). Осадок отмытых сенсibilизированных эритроцитов разводят ЗФР<sub>7,2</sub> до получения 0,5 % взвеси, к ней добавляют 4 % раствор БСА до конечной его концентрации 0,2 %, 20 % раствор натрия азида до конечной его

концентрации 0,2 % и 1% нормальной человеческой сыворотки, выдерживают 2 суток при 2-8 °С.

#### 2.1.7. Контроль КЭ и ТЭ в РПГА

Новые серии реагентов контролируют в РПГА на соответствие требованиям ТУ на набор при исследовании стандартных сывороток, содержащих и не содержащих антитела к *Treponema pallidum*, используя новые серии параллельно КЭ и ТЭ референс-серии набора.

#### 2.1.8. Розлив, укупорка, маркировка

КЭ и ТЭ разливают по флаконам, укупоривают и маркируют флаконы в соответствии с требованиями ТУ на набор.

#### 2.1.9. Хранение до комплектации набора

Готовые реагенты хранят до комплектации набора при 2-8 °С.

### 2.2. Набор "Vi-Сальмонелла-РПГА"

#### 2.2.1. Приготовление 50% взвеси эритроцитов

Используют дефибринированную баранью кровь (ТУ9389-073-70423725-2007).

В препарат дефибринированной крови добавляют 10% раствор азидата натрия до конечной концентрации 0,1%. Центрифугируют 15 мин при 10<sup>0</sup>С, 2000 об/мин.

Осадок эритроцитов разводят раствором Олсвера в соотношении 1:3, полученную суспензию выдерживают 60 мин при 2-8 °С. Вновь центрифугируют 15 мин при 10<sup>0</sup>С, 2000 об/мин. Осадок разводят ФР в соотношении 1:3. Центрифугируют 15 мин при 10<sup>0</sup>С, 2000 об/мин, осадок трехкратно отмывают ЗФР (разведение 1:3, центрифугирование 15 мин при 10<sup>0</sup>С, 2000 об/мин).

После последней отмывки осадок эритроцитов суспендируют в равном объеме ЗФР, получив 50% взесь отмывтых эритроцитов.

#### 2.2.2. Приготовление рабочего раствора антигена

Лиофилизированный препарат Vi-антигена разводят ЗФР до концентрации 15 мкг/мл.

### 2.2.3. Подготовка эритроцитов для сенсибилизации

Препарат 50% формализированных (фиксированных) эритроцитов перемешивают интенсивным встряхиванием до получения гомогенной взвеси. Центрифугируют 15 мин при 10<sup>0</sup>С, 2000 об/мин. Осадок эритроцитов разводят ЗФР в соотношении 1:3. Отмывку провести еще 2 раза. После последней отмывки развести осадок ЗФР до оптической плотности 250±10 ОЕ/мл.

### 2.2.4. Приготовление концентрата сенсибилизированных эритроцитов (ТЭ<sub>x10</sub>)

Ко взвеси эритроцитов с ОП 250±10 ОЕ/мл добавляют равный объем рабочего раствора Vi-антигена, выдерживают полученную смесь 1 ч при комнатной температуре на шейкере при 50 об/мин. Центрифугируют 15 мин при 10<sup>0</sup>С, 2000 об/мин, осадок разводят ЗФР<sub>-с 0,5%</sub> 1:3. Отмывку проводят еще дважды. После последней отмывки осадок разводят ЗФР<sub>-с 1%</sub> до ОП 25±5 ОЕ/мл, к полученной суспензии добавляют формальдегид до конечной концентрации 0,25%.

### 2.2.5. Приготовление ТЭ

Концентрат ТЭ перемешивают до получения гомогенной взвеси, разводят ЗФР<sub>-с 1%</sub> до ОП 2,2±0,05 ОЕ/мл, добавляют формальдегид до конечной концентрации 0,25%.

### 2.2.6. Приготовление концентрата контрольных эритроцитов (КЭ<sub>x10</sub>) и КЭ

Выполняют операции, указанные в п. 2.2.4 и 2.2.5, кроме внесения Vi-антигена; вместо него 50% взвесь формализированных эритроцитов смешивают с равным объемом ЗФР.

### 2.2.7. Контроль КЭ и ТЭ в РПГА

Новые серии реагентов контролируют в РПГА на соответствие требованиям ТУ на набор при исследовании стандартных сывороток, содержащих и не содержащих антитела к Vi-антигену, используя новые серии параллельно КЭ и ТЭ референс-серии набора.

### 2.2.8. Розлив, укупорка, маркировка

КЭ и ТЭ разливают по флаконам, укупоривают и маркируют флаконы в соответствии с требованиями ТУ на набор.

### 2.2.9. Хранение до комплектации набора

В технологии приготовления контрольного положительного и контрольного отрицательного образцов ( $K^+$  и  $K^-$ ) для указанных наборов нет принципиальных отличий; нет принципиальных отличий и от технологии приготовления соответствующих контролей для других иммунохимических методов исследования, хотя в деталях эти технологии могут, разумеется, отличаться.

#### *Приготовление контрольных образцов*

##### *1. Набор "Сифилис-РПГА-тест"*

Сырьем для получения  $K^-$  и  $K^+$  служит предварительно охарактеризованная по содержанию антител к *Treponema pallidum* сыворотка (плазма) крови человека или кролика.

##### 1.1. Инактивация сыворотки (плазмы)-сырья

Сырье инактивируют прогреванием при 56 °С в присутствии хлороформа (10 мл на 100 мл сырья) в течение 2 ч.

##### 1.2. Диализ сыворотки (плазмы)-сырья

Готовят раствор для диализа.

Состав: натрий хлористый, кальций хлористый, вода очищенная .

Готовят диализную мембрану и проводят диализ в течение 24 ч при 2-8 °С.

##### 1.3. Центрифугирование

Диализованную сыворотку центрифугируют 60 мин при 8000 об/мин при 2-8 °С. Супернатант фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

##### 1.4. Добавление консервантов

В полученный объем сыворотки, вносят (из расхода на 100 мл сыворотки) 1,000 г БСА; 0,050 г фенола; 0,020 г бронедекса.

##### 1.5. Фильтрация

Полученные  $K^-$  и  $K^+$  фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм или 0,65 мкм.

##### 1.6. Контроль в РПГА

Профильтрованные реагенты контролируют в РПГА, определяя их соответствие требованиям ТУ на набор.

### 1.7. Розлив, укупорка, маркировка

Проводят розлив реагентов, укупорку и маркировку в соответствии с требованиями ТУ на набор.

### 1.8. Хранение до комплектации набора

До использования при комплектации набора реагенты хранят при 2-8 °С.

## 2. Набор "Vi-Сальмонелла-РПГА"

$K^+$  готовят из крови иммунизированных лабораторных животных, предварительно инактивированную прогреванием при 56 °С в присутствии 1% хлороформа); в качестве  $K^-$  используют буферный раствор для разведения контрольных образцов (БОК).

### 2.1. Приготовление БОК

Состав:  $FR_{x25}$ , 0,5 моль/л раствор натрия фосфорнокислого двузамещенного, 0,5 моль/л раствор калия фосфорнокислого двузамещенного, 10 % раствор азиды натрия, вода очищенная.

В БОК вносят БСА (20 г на 1 л раствора), выдерживают 2-3 ч при комнатной температуре, перемешивают до полного растворения БСА. Измеряют рН (должен быть 7,2-7,8).

### 2.2. Подготовка (осветление) сырья для $K^+$

В инактивированное сырье добавляют азид натрия до конечной концентрации 0,1 %. Центрифугируют при 8000 об/мин, в течение 60 мин при 4-8°С, полученный супернатант фильтруют через фильтр ФПСВ.

### 2.3. Контроль сырья в РПГА

Осветленное сырье разводят БОК в 20 раз. Цельное и разведенное сырье контролируют в РПГА с набором "Vi-Сальмонелла-РПГА".

Сырье принимается к дальнейшему использованию при отрицательной реакции с КЭ и положительной реакции, не мене (4+), с ТЭ набора «Vi-сальмонелла РПГА». Титр антител к Vi-антигену в сырье, определенный при полуколичественном анализе, должен быть не менее 1:640.

Если титр цельной сыворотки превышает 1:12800, то титр препарата определяют по разведенному в 20 раз образцу. Разведение, в котором титр антител составляет 1:320, принимается за рабочее разведение сырья для получения  $K^+$ .

### 2.3. Приготовление $K^+$

При использовании размороженного сырья, ранее прошедшего контроль в РПГА, оно вновь контролируется в РПГА для определения его рабочего разведения путем определения титра пробных разведений сырья в БОК; рабочим считают разведение, при котором получена реакция интенсивностью +4 в титре 1:320 и не менее +1 в титре 1:640.

Сырье разводят БОК до установленного рабочего разведения.

### 2.4. Контроль реагентов в РПГА

Проверяют в РПГА соответствие полученных  $K^+$  и  $K^-$  требованиям ТУ на набор.

### 2.5. Розлив, укупорка, маркировка

Проводят розлив реагентов, укупорку и маркировку в соответствии с требованиями ТУ на набор.

### 2.6. Хранение до комплектации набора

До использования при комплектации набора реагенты хранят при 2-8 °С.

В технологии приготовления неспецифического реагента наборов – буферного раствора для разведения исследуемых образцов, используемого при определении в них титра антител, также нет принципиальных отличий от технологии приготовления аналогичных реагентов для других иммунохимических методов исследования. Эти растворы отличаются друг от друга только составом, который отрабатывается в соответствующих экспериментальных исследованиях.

### **2.5.3. Производство наборов реагентов для постановки реакции агглютинации латекса**

Поскольку на поверхности латексных частиц можно сорбировать не только антигены, но и видоспецифические антитела, латексные диагностикумы могут



использоваться для выявления в исследуемых образцах как видоспецифических антител, так и соответствующих патогенов.

#### Типовой состав латексных диагностикумов

- латексный реагент (взвесь частиц латекса с сорбированными на них антигенами или антителами);
- контрольные образцы (образцы, заведомо содержащие/не содержащие соответствующий аналит либо содержащие его в каких-то заданных титрах или концентрациях);
- физиологический раствор (ФР) для разведения исследуемых образцов при определении титра аналита в образце.

В латексные диагностикумы, предназначенные для выявления в исследуемых образцах специфических антигенов, могут входить два латексных реагента – латексный тест-реагент (на поверхности латексных частиц сорбированы специфические иммуноглобулины к выявляемому аналиту) и латексный контрольный реагент (на поверхности латексных частиц сорбированы неспецифические иммуноглобулины), набор, кроме того, может включать раствор для разведения образцов. Возможны и другие отличия от типового состава, определяемые конкретным назначением соответствующего диагностикума.

Ниже приводятся примеры состава латексных диагностикумов различного назначения:

#### *Состав диагностикума "АСО-латекс-тест" (Латексный диагностикум для определения антистрептолизина-О)*

- АСО-латексный реагент – суспензия частиц полистирольного латекса с иммобилизованным на них стрептолизин-О.
- физиологический раствор (ФР) – 0,9 % раствор натрия хлорида;
- положительная контрольная сыворотка (К+) - жидкая сыворотка крови человека, содержащая АСО в концентрации более 200 МЕ/мл;

- отрицательная контрольная сыворотка (K-) - жидкая сыворотка крови человека, содержащая АСО в концентрации менее 150 МЕ/мл.

*Состав диагностикума "Аденоскрин-латекс-тест" (Латексный диагностикум для выявления аденовирусного антигена)*

- латексный тест-реагент – суспензия частиц полистирольного латекса с иммобилизованными на них кроличьими анти-аденовирус антителами;
- латексный контрольный реагент – суспензия частиц полистирольного латекса с иммобилизованным на них нормальным глобулином кролика;
- контрольный положительный образец (K+) – инактивированные бычьи аденовирусные изоляты в забуференной культуральной среде с антибиотиками;
- раствор для разведения образцов (РРО).

*Состав диагностикума "ИМ-латекс-тест" (Латексный диагностикум для определения гетерофильных антител при инфекционном мононуклеозе)*

- латексный реагент – суспензия частиц полистиролового латекса с иммобилизованными на них антигенами мембран бычьих эритроцитов;
- физиологический раствор (ФР) – 0,9 % раствор натрия хлорида;
- контрольный положительный образец (K+) – сыворотка крови человека, содержащая гетерофильные антитела (ГА) в титре не менее чем 1:4;
- контрольный отрицательный образец (K-) – сыворотка крови человека, не содержащая ГА к возбудителю ИМ.

*Состав диагностикума "Стафи-латекс-тест" (Латексный диагностикум для дифференциации стафилококков)*

- Латексный реагент – суспензия частиц полистиролового латекса с иммобилизованными на них белками человеческой плазмы (фибриноген и иммуноглобулины класса G) и/или бычьим сывороточным альбумином;
- Контрольный положительный образец (K+) – препарат инактивированной культуры *Staphylococcus aureus*.

*Состав диагностикума "Стрепто-латекс-тест" (Латексный диагностикум для определения групповой принадлежности стрептококков)*

- латексные реагенты антиА, антиВ, антиС, антиD, антиF, антиG – суспензия частиц полистиролового латекса с иммобилизованными на них антителами к полисахаридам клеточной стенки стрептококков одной из групп А, В, С, D, F и G;
- поливалентный положительный контроль (K+);
- лиофилизированный экстрагирующий фермент.

Как следует из типового состава и конкретных примеров латексных диагностикумов их основными (специфическими) реагентами являются латексные реагенты и контрольные образцы.

Латексные реагенты готовят, сенсibiliзируя взвесь частиц полистирольного латекса иммунохимически активным компонентом – антигеном, для выявления антител к которому предназначается набор, или антителами к антигену, наличие или отсутствие которого оценивается в анализируемой пробе.

Одним из самых простых методов присоединения молекул к полимерным гидрофобным частицам является пассивная адсорбция, в частности нековалентная адсорбция антител или антигенов на латексных микросферах, которая происходит благодаря сильному взаимодействию неполярных или ароматических аминокислотных остатков с поверхностью полимерных цепей частиц с сопутствующим исключением молекул воды. Т.к. протеины обычно имеют гидрофобное ядро и преимущественно гидрофильную поверхность, их взаимодействие с гидрофобными частицами должно включать значительные изменения конформации для увеличения поверхности гидрофобного контакта, приводящие к денатурации первого слоя протеинов, адсорбированного на частицах. Последующие молекулы белка, которые присоединяются к изначальному слою, адсорбируются за счет белок-белковых связей или процесса агрегации, что ведет к формированию белковых кластеров, в которых другие слои белков находятся в более нативной кон-

формации и потому более активны. Способность белков к формированию многослойного покрытия на гидрофобной поверхности ведет к избыточному количеству белков на точке насыщения (теоретической плотности монослоя).

*Получение латексного реагента методом пассивной абсорбции*

1. Готовят взвесь частиц полистирольного латекса с концентрацией 10 мг/мл в сорбирующем буферном растворе. При спонтанной агрегации частиц начальную концентрацию снижают до 5 мг/мл.

В качестве буферного раствора могут быть использованы:

- 10 mM фосфатный буферный раствор, pH 7,4;
- 50 mM боратный буферный раствор, pH 8,5;
- 50 mM ацетатный буферный раствор pH 3,6-5,6;
- 25 mM MES, pH 6,1;
- 50 mM карбонат-бикарбонатный буферный раствор, pH 8,5-9,5.

К этим растворам при необходимости может быть добавлено 0,15 M хлористого натрия для стабилизации белка.

2. Готовят раствор белка (антител или антигена) в сорбирующем буферном растворе с таким расчетом, чтобы при смешении с суспензией частиц была достигнута концентрация белка, в 3-10 раз превышающая максимальную плотность монослоя белка на частицах. Для определения оптимальной концентрации белка испытывают ряд растворов, обеспечивающих указанную кратность максимальной плотности монослоя. Например, при использовании частиц размером 300 нм, следует провести пробные сорбции в области 10-200 мг белка/мг частиц.

3. Подобранный раствор белка добавляют к суспензии частиц при интенсивном перемешивании, продолжают перемешивание в течение 1 ч при комнатной температуре.

4. Удаляют из смеси избыток белка двукратным промыванием адсорбционным буферным раствором с использованием центрифугирования или фильтрации. Для более полного удаления избыточного белка возможна обработка ультразвуком.

5. Полученную взвесь доводят адсорбционным буферным раствором до конечной концентрации 1 %

Готовый реагент контролируют в РАЛ на соответствие требования ТУ на набор, а затем, как и все прочие жидкие реагенты, разливают по флаконам, укупоривают и маркируют в соответствии с требованиями ТУ на набор.

Технология приготовления контрольных образцов и неспецифических реагентов, входящих в латексные диагностикумы, аналогична технологии приготовления соответствующих реагентов для других иммунохимических исследований

#### **2.5.4. Производство наборов реагентов для реакции микропреципитации с кардиолипиновым антигеном**

В соответствии с действующим Приказом МЗ РФ № 87 от 26.03.2001 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» серо- и ликвородиагностика сифилиса должна начинаться с постановки РМП с кардиолипиновым антигеном (АгКЛ), которая используется также для контроля эффективности лечения.

В этом случае РМП основана на выявлении антител к *T.pallidum* в реакции с антигеном, сходным по составу с антигеном клеточной стенки возбудителя, включающим фосфолипид, лецитин и холестерин, антитела к которому, представляющие липопротеидные образования-реагины (преципитины), формируются на ранних стадиях инфекционного процесса и достаточно быстро исчезают, особенно после окончания полноценной терапии .

В настоящее время в практике лабораторных исследований используются наборы реагентов, позволяющие реализовывать как "классическую" версию РМП с АгКЛ, так и различные ее модификации.

Набор реагентов для "классической" версии РМП с АгКЛ может выпускаться в двух вариантах. Первый включает два реагента – концентрированный раствор холин-хлорида в 0,9% растворе хлористого натрия и АгКЛ - в виде раствора в спирте этиловом абсолютном трех высокоочищенных липидов -

кардиолипина; лецитина и холестерина. При этом для постановки реакции вначале необходимо приготовить рабочий раствор холин-хлорида, на котором, в свою очередь, готовится рабочая эмульсия AgКЛ. По этой причине большее распространение на сегодня имеет второй вариант, который включает уже готовую для использования эмульсию AgКЛ и контрольный положительный образец.

На рис. 96 приведена типовая технология производства такого набора.

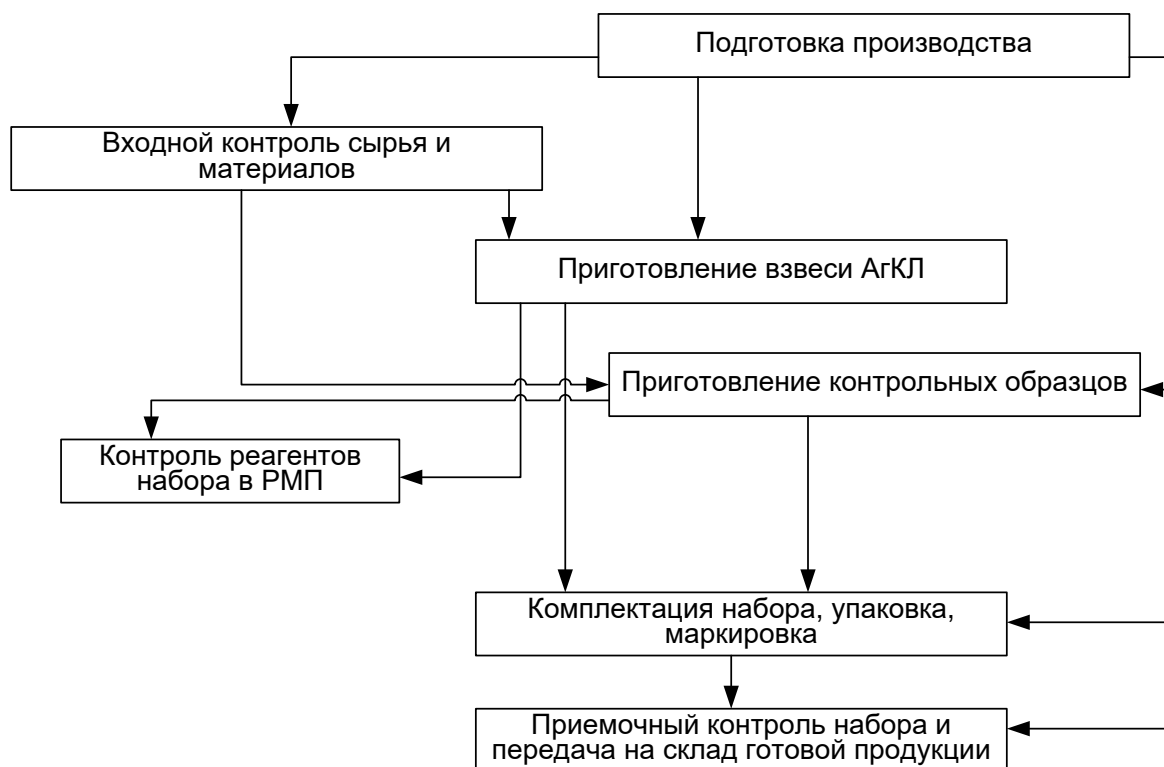


Рис. 96. Типовая технологическая схема производства наборов реагентов для РМП с AgКЛ

Как видно из схемы, основным специфическим элементом технологии производства этих наборов является приготовление взвеси AgКЛ, поскольку все прочие стадии и операции технологического процесса не имеют принципиальных отличий от технологии производства наборов реагентов для других методов иммунохимических исследований.

## *Технология приготовления взвеси АгКЛ, готовой к использованию*

### 1. Приготовление буферного раствора

Состав: ДТА динатриевая соль, натрий фосфорнокислый 2-замещенный, калий фосфорнокислый 1-замещенный, холин-хлорид, тимеросал (мертиолят), вода очищенная.

### 2. Приготовление взвеси АгКЛ

#### 2.1. Приготовление спиртового раствора липидов

Состав: кардиолипин, лецитин, холестерин, спирт этиловый абсолютный.

Готовят необходимые навески липидов, вносят их в чистую сухую емкость с притертой пробкой, добавляют в емкость необходимый объем спирта этилового абсолютного, плотно закрывают емкость притертой пробкой и перемешивают до полного растворения липидов.

#### 2.2. Приготовление взвеси АгКЛ

Состав: раствор липидов, буферный раствор.

В чистую, сухую емкость с притертой пробкой вносят необходимые объемы раствора липидов и буферного раствора, тщательно перемешивают.

#### 2.3. Контроль в РМП

Каждую новую серию взвеси АгКЛ контролируют в РМП с референс-серией набора "Сифилис-АгКЛ-РМП" (комплект № 2) при исследовании охарактеризованных ранее образцов положительных и отрицательных сывороток, используя при постановке контролируемую серию взвеси параллельно взвеси из референс-набора.

#### 2.4. Розлив, укупорка, маркировка.

Проводят розлив АгКЛ по флаконам, укупорку и маркировку флаконов в соответствии с требованиями ТУ на набор.

#### 2.5. Хранение до комплектации набора

Маркированные флаконы до использования при комплектации хранят при 2-8 °С.

Как уже отмечено, кроме "классического" варианта РМП с АгКЛ в лабораторной диагностике сифилиса используется также ряд ее модификаций – RPR, VDRL, USR, RST, TRUST. От "классического" варианта они отличаются только агрегатным состоянием АгКЛ или его происхождением.

В RPR–тесте в стабилизированный стандартный АгКЛ добавлены частицы мелкодисперсного угля, который позволяет визуализировать флоккулят и учитывать результаты реакции невооруженным глазом.

VDRL–тест отличается от "классического" варианта только происхождением АгКЛ (разработчик теста VENEREAL Disease Research Laboratory).

USR–тест (Unheated serum reagins) – это модификация антигена, используемого в VDRL, путем добавления холинхлорида и ЭДТА с целью стабилизации антигенного комплекса.

RST – реагиновый скрининговый тест – это, в свою очередь, модификация USR–теста, отличающаяся от него тем, что при отсутствии визуализации реакции "антиген-антитело" в реакционную смесь добавляют липид–растворимую субстанцию.

TRUST (Toluidin Red Unheated Serum test) – это фактически модификация RPR–теста, в котором для оптимизации визуального учета (невооруженным глазом) в АгКЛ дополнительно введена мелкодисперсная суспензия водонерастворимого красителя толуидинового красного (иногда суданового черного).

Изо всех этих модификаций в Российской Федерации наиболее употребителен RPR–тест.

В состав набора реагентов для него входят RPR–реагент и контрольные (положительный и отрицательный) образцы.

Технология приготовления этого набора отличается от технологии приготовления набора для "классического" варианта РМП с АгКЛ только наличием операции внесения в готовую взвесь АгКЛ высокодисперсной угольной суспензии.



До последнего времени основным недостатком серологических исследований методом РМП являлась визуальная регистрация результатов, которая неизбежно связана с субъективизмом дискриминации положительных и отрицательных образцов. Визуальная регистрация, кроме того, не обеспечивает документальную фиксации самой картины реакции, поскольку в качестве документа при ней остается только бланк проведения анализа с заключением оператора (лаборанта или врача, проводившего анализ). Это повышает вероятность ошибок лабораторного персонала, исключает возможность проведения объективного ретроспективного анализа спорных (судебных) результатов, затрудняет работу по созданию современной отчетно-учетной документации и автоматизированной базы данных.

Эффективным способом устранения этого недостатка явилось использование видеоцифровой регистрации результатов РМП, т.е. получение изображения реакционной смеси, в которой проведена РМП, с помощью цифрового фотоаппарата или сканера с последующей математической обработкой этого изображения специализированным программным обеспечением, позволяющим определить наличие или отсутствие преципитата в смеси реагента и образца. На рис. 97 приведена схема реализации такого способа регистрации РМП.

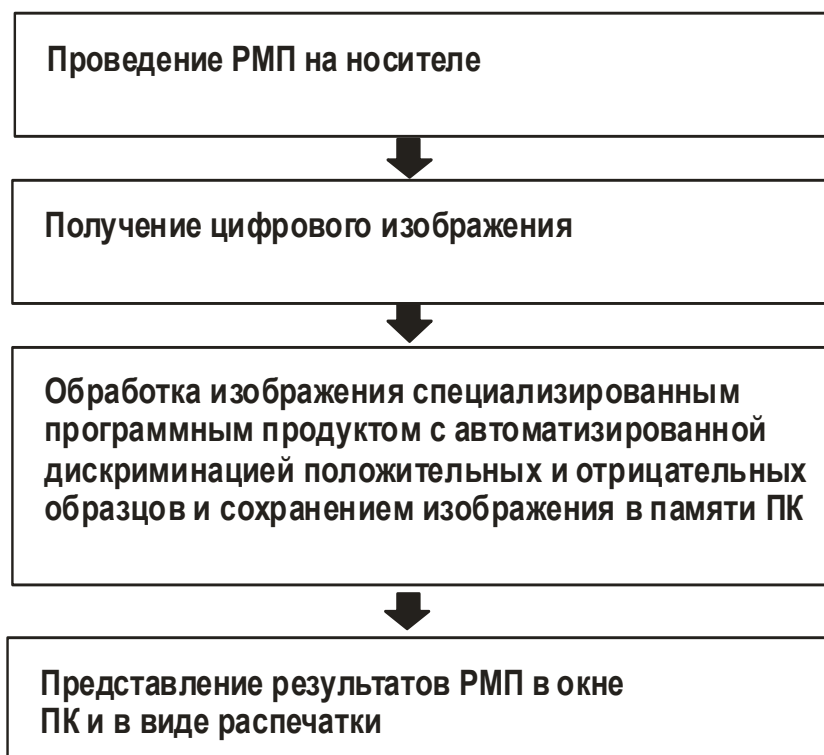


Рис. 97. Схема реализации способа автоматизированной оценки и документирования результатов реакции микропреципитации.

На (рис. 98) показано окно ПО регистрации результатов РМП. Изображение пластины в данном окне приведено в режиме, где преципитаты с помощью определенного алгоритма помечаются красными точками. Также демонстрируется функция «лупа», позволяющая анализировать увеличенное изображение каждой лунки. В данном окне анализируется лунка 2-III, выделенная синим цветом на схеме пластины.

Дискриминация положительных и отрицательных образцов и оценка интенсивности реакции в каждой лунке производится при этом на основе расчетной цифровой оценки интенсивности реакции преципитации в условных единицах. Эти цифры приводятся для каждой лунки наряду с традиционной оценкой интенсивности в виде «крестов» или «плюсов». Эти же данные приводятся на бумажном носителе (рис. 99), который может быть вклеен в журнал регистрации анализов или историю болезни.

Как видно из рис. 98, итоговый протокол постановки РМП включает как традиционную ранговую (в "крестах"), так и количественную (в условных единицах, УЕ) оценку исследованных образцов.

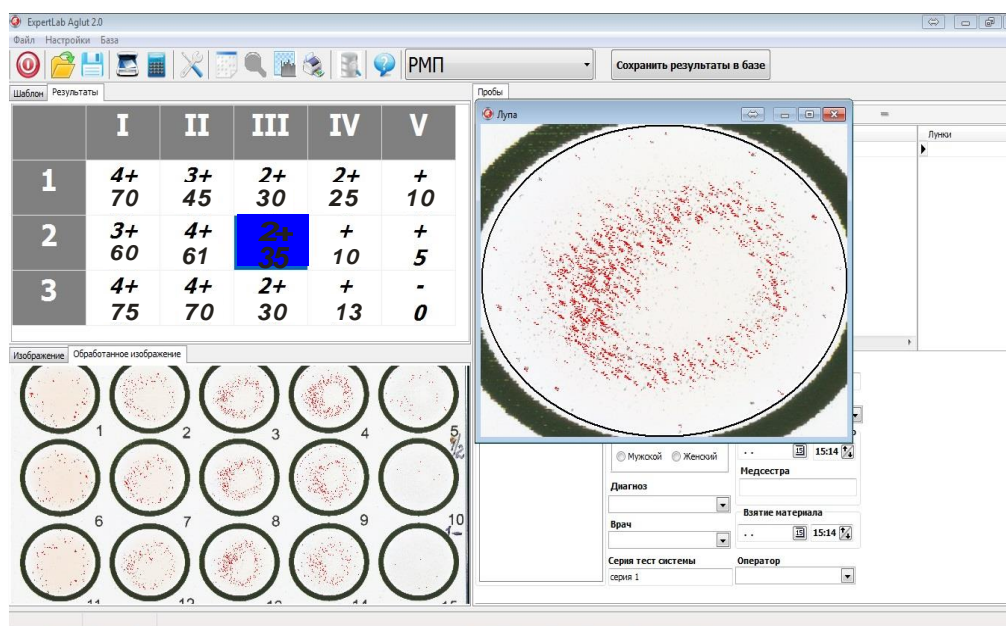


Рис. 98. Представление результатов регистрации РМП в сканирующем устройстве в основном окне ПО в варианте демонстрации изображения, обработанного для визуализации преципитатов.

На носителе размещены 3 положительных образца в серийных разведениях: колонка I – исходные образцы; колонки II, III, IV, V – разведения исходных образцов 1/2; 1/4; 1/8; 1/16, соответственно

	I	II	III	IV	V
1	4+ 70	3+ 45	2+ 30	2+ 25	+ 10
2	3+ 60	4+ 60	2+ 35	+ 10	+ 5
3	4+ 75	4+ 70	2+ 30	+ 13	- 0

20.08.2013 15:25:55	
<b>Пробы</b>	
Измерения	15
Контроль -	0
Контроль +	0
<b>Всего</b>	<b>15</b>
<b>Результаты</b>	
Отрицательно	1
Неопределено	0
Слабоположительно	4
Положительно 2+	4
Положительно 3+	2
Положительно 4+	4

Рис. 99. Распечатка результатов регистрации реакции РМП в сканирующем устройстве в основном окне ПО.

Расположение образцов на носителе – как на рис. 90.

Такой способ регистрации результатов РМП позволяет:

- получать цифровое изображение картины реакции с сохранением его в памяти ПК;
- автоматически дискриминировать положительные и отрицательные образцы;
- автоматически формировать отчеты в базе данных;
- проводить повторную обработку исходного изображения;
- представлять результаты на бумажном носителе.

Следовательно, его практическое использование позволит:

- устранить субъективизм оценки результатов РМП;
- стандартизировать оценку результатов;
- исключить возможность ошибки персонала: при поиске лунки, при сопоставлении результата РМП с пациентом, при соблюдении порядка считывания результатов, при составлении протокола и т.д;
- получать результат РМП в виде распечатки, удобной для вклеивания в журнал;
- создать и вести соответствующую базу данных;
- проводить ретроспективный контроль правильности проведения исследований;
- создать объективную основу для межлабораторного общения, связанного с результатами РМП;
- предоставлять по результатам исследований документацию на уровне требований доказательной медицины.

В итоге один из самых старых методов исследования, в силу ряда особенностей регистрируемой им реакции сохраняющий до сегодняшнего дня свое значение в лабораторной диагностике сифилиса, благодаря сочетанию с видеоцифровой регистрацией результатов анализа, становится в один ряд с наиболее современными методиками и способами исследования.

## 2.5.5. Производство наборов реагентов для иммунофлюоресцентного анализа

В наборах для прямой РИФ обязательным является только реагент, меченый флюорохромом. Если этот реагент лиофилизирован, в набор может входить также раствор для его разведения. В зависимости от назначения набора он может, кроме того, комплектоваться реагентами для дополнительной обработки исследуемых образцов или реагентами, облегчающими постановку и(или) учет результатов. Состав наборов для непрямой РИФ обычно более сложен. Помимо антигена, антитела к которому являются определяемым анализом, в набор обязательно должен входить меченый флюорохромом конъюгат. Кроме этих двух специфических компонентов в набор могут входить контрольные образцы, содержащие и не содержащие определяемый анализ. В число неспецифических (вспомогательных) реагентов могут входить концентрат промывающего раствора, раствор для разведения конъюгата (если используется лиофилизированный конъюгат), растворы для предварительной обработки контрольных и исследуемых образцов, а также реагенты, облегчающие постановку и(или) учет результатов.

Соответственно различаются и типовые технологические схемы производства наборов для обоих форматов РИФ (рис. 100, 101)

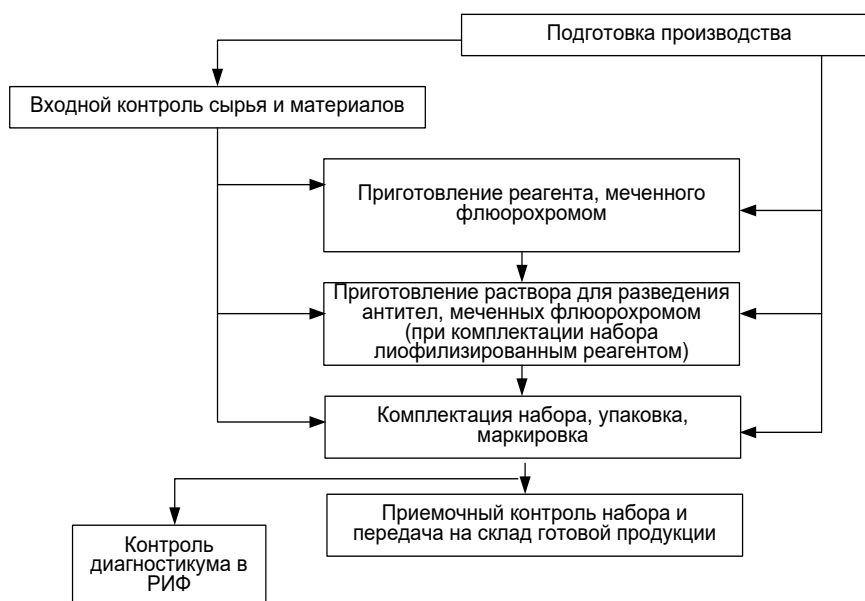


Рис. 100. Типовая технологическая схема производства наборов реагентов для прямой РИФ

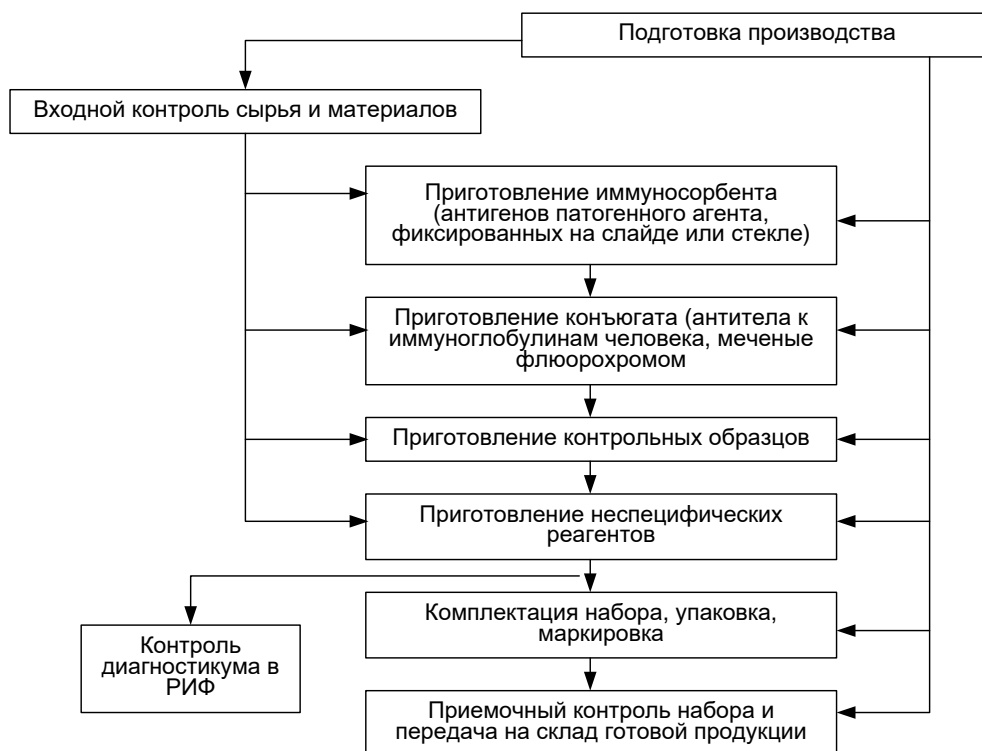


Рис. 101. Типовая технологическая схема производства наборов реагентов для непрямой РИФ.

Основной особенностью технологии производства наборов как для прямой, так и для непрямой РИФ является приготовление реагентов, меченных флюорохромом, причем технология получения таких реагентов для обоих форматов РИФ, как правило, практически одинакова, поскольку и в том, и в другом случае речь чаще всего идет о связывании с флюорохромом белков – специфических антител к выявляемым антигенам для прямой РИФ и видоспецифических антител к иммуноглобулинам человека для непрямой РИФ.

Примером может служить получение реагентов, меченых флюоресцеинизотиоцианатом.

### *Приготовление реагентов, меченых флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ)*

#### 1. Приготовление вспомогательных растворов

1.1. 10-кратный концентрат (1 моль/л) фосфатного буферного раствора (ФСБ<sub>×10</sub>)

Состав: натрий фосфорнокислый 2-замещённый 12-водный, натрий фосфорнокислый 1-замещённый 2-водный, натрий хлористый, вода очищенная.

1.2. 0,1М фосфатный буферный раствор (ФСБ)

Состав: ФСБ<sub>x10</sub>, вода очищенная.

1.3. 10-кратный концентрат (1 моль/л) карбонатно-бикарбонатного буферного раствора (КББ<sub>x10</sub>)

Состав: натрий углекислый, натрий двууглекислый, вода очищенная.

1.4. 0,1 моль/л карбонатно-бикарбонатный буферный раствор (КББ)

Состав: КББ<sub>x10</sub>, вода очищенная .

## 2. Подготовка антител

Раствор антител не должен содержать азид натрия, в противном случае перед проведением конъюгации необходимо освободиться от следов азидов путем проведения диализа против ФСБ в течение 48 ч при 2-8 °С.

## 3. Выбор оптимального соотношения ФИТЦ-белок

Готовят ряд пробных ФИТЦ-реагентов с различным соотношением ФИТЦ-белок и используют их в РИФ с референс-серией набора, для которого готовится ФИТЦ-реагент, параллельно ФИТЦ-реагенту референс-серии. Постановку выполняют в соответствии с требованиями раздела "Определение специфической активности" ТУ на набор. Оптимальным считают соотношение ФИТЦ-белок, при котором результаты РИФ с пробным ФИТЦ-реагентом полностью соответствуют результатам РИФ с ФИТЦ-реагентом референс-серии.

## 4. Приготовление ФИТЦ-реагента

Исходя из полученного оптимального соотношения ФИТЦ-белок, рассчитывают количества ФИТЦ и антител, необходимые для получения заданного объема реагента. Проводят конъюгацию, полученный реагент очищают хроматографически, добавляют к нему БСА (до 1%) и азид натрия (до 0,1%).

5. Контролируют качество полученного ФИТЦ-реагента в РИФ (см. п. 3), разливают реагент по флаконам (при необходимости проводят его лиофилизацию), укупоривают и маркируют флаконы, хранят до комплектации набора при 2-8 °С.

Отличительной особенностью технологического процесса производства наборов для непрямой РИФ является приготовление реагентов, представляющих фиксированные на плотной подложке антигены патогенного агента, т.е. аналогов

иммуносорбентов в ИФА и ИБ. В качестве плотной подложки при этом обычно используют специальные (декорированные) предметные стекла с лунками. Если набор предназначен для выявления антител к возбудителям инфекционных заболеваний, в стадию приготовления такого иммуносорбента входят операции получения и при необходимости переработки биомассы соответствующего возбудителя.

В качестве примера можно привести получение иммуносорбента для наборов "Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG", "ВПГ-1-флюороген-скрин", "ВПГ-2-флюороген-скрин" и "ЦМВ-флюороген-скрин").

*Приготовление фиксированного на стекле антигена *Treponema pallidum*  
(иммуносорбент для набора "Антипаллидум-флюороген-IgM/IgG")*

1. Получение антигена *Treponema pallidum*

Антигеном служит биомасса *Treponema pallidum*, выделенная из семенников зараженных кроликов.

1.1. Заражение кроликов

Кроликов фиксируют в станке спиной вниз. Интратестикулярно вводят взвесь бледных трепонем (по 1 мл в каждый семенник).

1.2. Забор семенников

Отбирают кроликов с 7-10-дневным хорошо развитым орхитом. Каждого кролика фиксируют в станке и убивают путем тотального обескровливания. Асептически выделяют и отрезают семенники.

1.3. Приготовление взвеси *Treponema pallidum*

Каждый выделенный семенник в асептических условиях измельчают до кашицеобразного состояния, заливают стерильным 0,9% раствором натрия хлорида, из расчета 5 мл раствора на 1 семенник, встряхивают на шейкере 25 мин, затем полученную взвесь центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость (взвесь *Treponema pallidum*) сливают в стерильный флакон. С помощью темнопольной микроскопии (с окуляром x10 и объективом x40) контро-



лируют качество полученной суспензии *Treponema pallidum*. В одном поле зрения должно наблюдаться 50-60 хорошо подвижных с ненарушенной морфологией трепонем.

Полученную суспензию инактивируют и используют для приготовления иммуносорбента набора "Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG"

#### 1.4. Приготовление иммуносорбента

##### 1.4.1. Приготовление вспомогательных растворов:

###### *Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ)*

Состав: хлористый натрий, калий фосфорнокислый однозамещенный, калий фосфорнокислый двузамещенный трехводный, калия хлорид, азид натрия, вода очищенная.

###### *Раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА)*

Состав: БСА, вода очищенная.

##### 1.4.2. Подготовка предметных стекол для сорбции

Предметные стекла моют водопроводной водой и выдерживают в течение суток в 96% этиловом спирте для обезжиривания.

##### 1.4.3. Сорбция антигена *Treponema pallidum* на стекле

В каждую лунку специальных (декорированных) предметных стекол вносят по 30 мкл инактивированной суспензии *Treponema pallidum*. Стекла выдерживают 4 ч при 22-24 °С, после чего промывают их водой очищенной для удаления несорбированных на поверхности стекла трепонем, подсушивают 2 ч при 23±2 °С и относительной влажности воздуха не более 30%.

##### 1.4.4. Лиофильная сушка иммуносорбента

Стекла помещают в специальные пакеты из алюминиевой фольги на полиэтиленовой основе (ламинат) или из полиэтиленовой пленки и проводят окончательную сушку иммуносорбента в лиофилизаторе.

##### 1.4.5. Упаковка и маркировка иммуносорбента

Пакеты с предметными стеклами запаивают с помощью вакуум-упаковочной машины. Пакеты маркируют в соответствии с требованиями ТУ на набор.

##### 1.4.6. Контроль иммуносорбента в РИФ

Качество полученного иммуносорбента контролируют постановкой РИФ с референс-серией "Антипаллидум флюороген-IgG/IgM" в соответствии с требованиями ТУ (раздел "Методы испытаний", подраздел "Определение чувствительности и специфичности"), используя новую серию иммуносорбента параллельно с иммуносорбентом референс-серии

#### 1.4.7. Хранение до комплектации набора

Готовый реагент хранят до комплектации набора при 2-8 °С.

*Приготовление фиксированных на стекле антигенов вирусов простого герпеса 1 и 2 типов и цитомегаловируса (иммуносорбенты для наборов "ВПГ-1-флюороген-скрин", "ВПГ-2-флюороген-скрин", "ЦМВ-флюороген-скрин")*

#### 1. Получение антигенов

В качестве антигенов, фиксируемых на стекле, используются культуры клеток, инфицированные вакцинными штаммами указанных вирусов. Технология получения инфицированных клеточных культур аналогична технологии, используемой при получении.

#### 3. Сорбция антигена на предметных стеклах

Используют специальные предметные стекла с лунками (декорированные предметные стекла), их моют водой и обезжиривают в течении 5 минут ацетоном.

По 50 мкл суспензии инфицированных вирусом клеток вносят в лунки. Стекла выдерживают при 37 °С от 16 ч до 4 суток (в зависимости от природы вируса).

#### 4. Контроль качества сорбции

Одно стекло из партии используют для контроля качества сорбции, для чего промывают его водой, выдерживают 3 мин в 90 % ацетоне для фиксации антигена и проводят РИФ с использованием соответствующего использованному антигену контрольного положительного образца. При учете результатов реакции в каждой лунке предметного стекла должен наблюдаться под микроскопом ровный монослой инфицированных клеток, число которых должно быть не менее 60% от общего числа клеток.

## 5. Фиксация, лиофилизация, упаковка и маркировка антигена

При удовлетворительном результате контроля обрабатывают всю партию стекол и высушивают стекла в ламинарном шкафу в течении 2 ч, после чего помещают стекла в вакуумные пакеты, проводят лиофильную сушку и запаивают пакеты под вакуумом. Запаянные пакеты маркируют в соответствии с требованиями ТУ на набор.

6. Готовый антиген на стекле контролируют в РИФ с использованием референс-серии соответствующего набора.

## 7. Хранение до комплектации набора

Готовую партию антигена на стекле предметном хранят до комплектации набора при 2-8°C.

Технология приготовления контрольных положительных и отрицательных образцов практически та же, что и для других иммунохимических методов анализа.

Нет принципиальных отличий и в технологии приготовления вспомогательных компонентов наборов для РИФ. Можно отметить лишь различия в составах реагентов одинакового назначения в наборах для РИФ и для других методов исследования.

## **2.5.6. Производство наборов для иммуноферментного анализа**

### ***2.5.6.1. Типовой состав иммуноферментных тест-систем***

*Типовой состав ИФТС для прямого ИФА*

1. Иммуносорбент (специфический антиген или антитело к нему).
2. Антитело к специфическому антигену, меченое ферментом, или указанный антиген, меченый ферментом (конъюгат).
3. Контрольные образцы (образцы, заведомо содержащие и не содержащие выявляемый анализ, К<sup>+</sup> и К<sup>-</sup>).

4. Вспомогательные растворы (раствор для промывки планшетов, субстратный раствор, стоп-реагент, при необходимости – раствор для разведения образцов перед внесением в лунки планшета).

На рис. 102 приведена типовая схема постановки прямого ИФА.

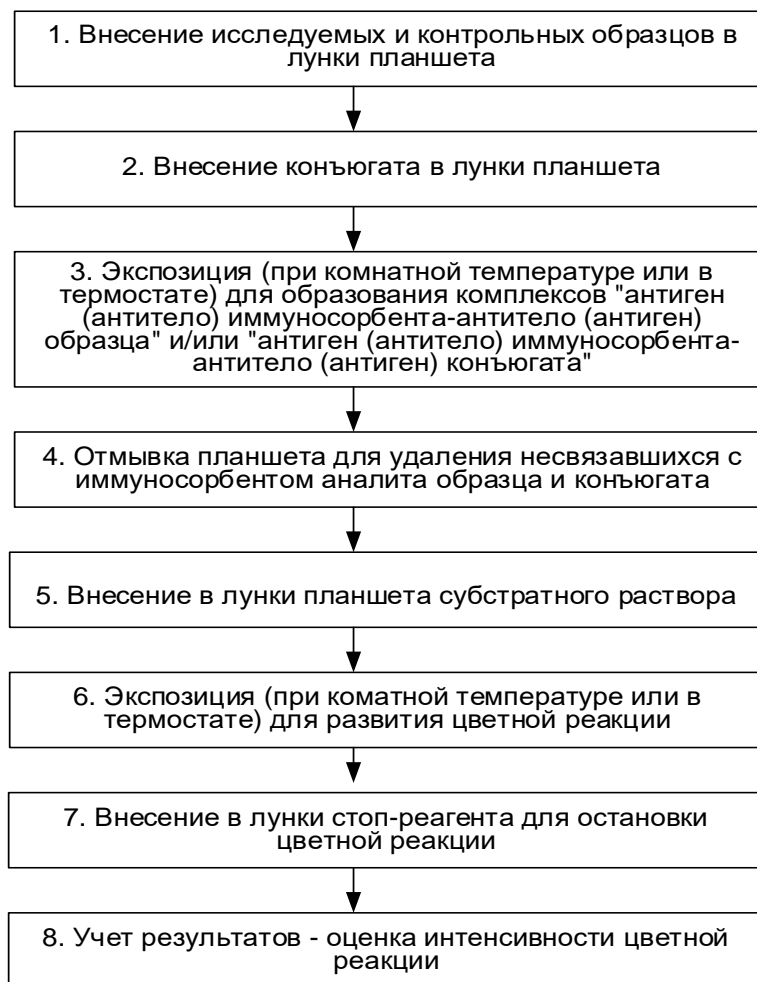


Рис. 102. Типовая схема постановки прямого ИФА.

Альтернативой прямому ИФА служит непрямой ИФА, при котором используется конъюгат, который вступает во взаимодействие с уже образованным комплексом "антиген-антитело".

*Типовой состав ИФТС непрямого ИФА:*

1. Иммуносорбент (сорбированные в лунках планшета специфические антигены или антитела к ним, или антитела к человеческим иммуноглобулинам).

2. Контрольные образцы (образцы, заведомо содержащие и не содержащие выявляемый анализ,  $K^+$  и  $K^-$ ).

3. Конъюгат (концентрированный препарат или готовый к применению) – антитела к человеческим иммуноглобулинам или специфический антиген, меченые ферментом.

4. Вспомогательные растворы (раствор для промывки планшетов, субстратный раствор, стоп-реагент, при необходимости – раствор для разведения образцов перед внесением в лунки планшета и раствор для разведения конъюгата при использовании в наборе его концентрата).

На рис. 103 приведена типовая схема постановки непрямого ИФА.



Рис. 103. Типовая схема постановки непрямого ИФА.

В зависимости от особенностей конкретных анализов, которые должны выявляться в ИФА, его форматы, т.е. схемы постановки могут отличаться от приведенных типовых, так, например, в практике нередко используется "сэндвич-метод" ИФА, при котором в зависимости от выявляемого анализа на иммуносорбенте образуется комплекс "специфическое антитело иммуносорбента-антиген образца-специфическое антитело, меченое ферментом" либо "антиген иммуносорбента-специфическое антитело образца-антиген, меченый ферментом", т.е. анализ как бы заключен между двумя слоями однотипного реагента, один из которых принадлежит иммуносорбенту, а второй является конъюгатом.

Могут отличаться от типовых и составы тест-систем. Так, если целью анализа является выявление в одной постановке не только антител к антигенам конкретного возбудителя, но и отдельных антигенов его, в лунках иммуносорбента могут быть сорбированы как соответствующие антигены, так и антитела, а в состав ИФТС могут быть включены два различных конъюгата с соответствующими растворами для их разведения. Если целью анализа является определение концентрации или титра анализа в исследуемом образце,  $K^+$  может быть представлен рядом образцов с известными концентрациями (титрами) анализа для построения по ним соответствующего калибровочного графика (графика зависимости ОП от содержания в пробе анализа), который затем используется для оценки содержания анализа в исследуемых образцах по полученным для них значениям ОП.

На рис. 104 представлена типовая технологическая схема производства ИФТС.

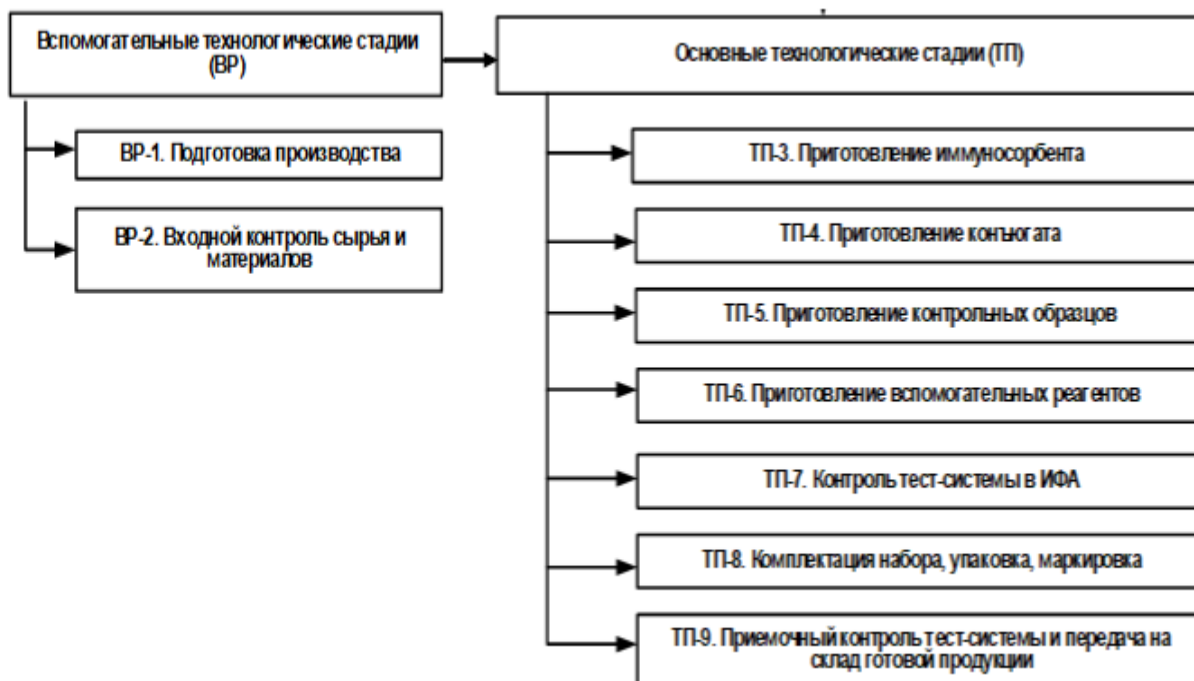


Рис. 104. Типовая технологическая схема производства ИФТС

Как следует из приведенной схемы, непосредственное производство любой ИФТС начинается с таких вспомогательных работ, как подготовка производства и входной контроль сырья и материалов.

О роли полноценной подготовки производства уже сказано выше. Еще более важным элементом технологического процесса является входной контроль, т.е. оценка качества и, соответственно, пригодности для использования поступившего на предприятие сырья и материалов в производстве конкретного набора. Его задачи и порядок проведения рассмотрены в разделе 2.5.9, посвященном организации технического контроля производства МИ<sub>ивд</sub>.

### ***2.5.6.2. Приготовление основных (специфических) реагентов***

К основным реагентам ИФТС, определяющим специфичность анализа, относятся иммуносорбент, контрольные образцы и конъюгат (в тест-системах для непрямого ИФА).

### 2.5.6.2.1. Приготовление иммуносорбентов

Иммуносорбент для ИФА – это, чаще всего, пластиковый (полистировый) планшет для микротитрования на 96 лунок с плоским дном (рис. 105), на внутренней поверхности которых сорбированы антигены соответствующего возбудителя (антигенный иммуносорбент) или антитела к нему (антительный иммуносорбент).

Основной характеристикой любого иммуносорбента является его аналитическая чувствительность и специфичность, т.е. минимальные концентрации аналита, которые можно выявить с помощью иммуносорбента, и уровень неспецифических реакций, которые могут существенно исказить конечный результат исследования. Оба эти показателя зависят от характеристик как планшета, используемого для сорбции, так и от характеристик

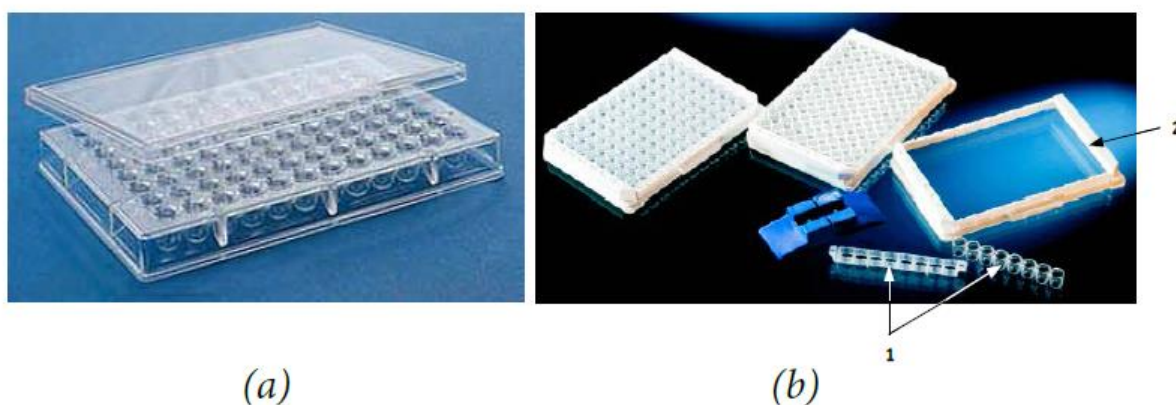


Рис. 105. Планшеты для ИФА

(a) Цельный планшет с крышкой. (b) Стипированный, т.е. разделяющийся на отдельные стрипы планшет; стрипы (1) собираются в рамку (2).

В настоящее время известен ряд фирм, чьи планшеты используются в производстве ИФТС. По заявленным фирмами-производителями характеристикам конкретных модификаций планшетов (например, по их сорбционной активности) существенных различий в их продукции нет, однако практика их использования показывает необходимость предварительной оценки пригодности конкретных модификаций конкретных фирм-производителей в производстве иммуносорбен-



тов для конкретных ИФТС. Такая оценка может быть сделана только по результатам прямых предварительных исследований таких планшетов – при изготовлении и испытаниях соответствующих пробных иммуносорбентов.

Так, например, в практике работы ЗАО "ЭКОлаб" при производстве ИФТС для диагностики сифилиса и хламидиозов используются планшеты со средне-сорбционной способностью фирмы Nunc (Дания), при производстве ИФТС для диагностики ВИЧ-инфекции – планшеты той же фирмы, но с высокосорбционной способностью, при производстве ИФТС для диагностики инфекций TORCH-группы – также планшеты фирмы Nunc с высокосорбционной способностью, но с ломающимися на отдельные лунки стрипами.

Общая технологическая схема приготовления иммуносорбента (приведена на рис. 106) включает следующие операции:

1. Приготовление вспомогательных растворов.
2. Приготовление рабочего разведения антигенов (антител).
3. Розлив рабочего разведения по лункам планшета и сорбция.
4. Отмывка планшета.
5. Блокирование иммуносорбента.
6. Повторная отмывка планшета.
7. Сушка, упаковка, маркировка иммуносорбента

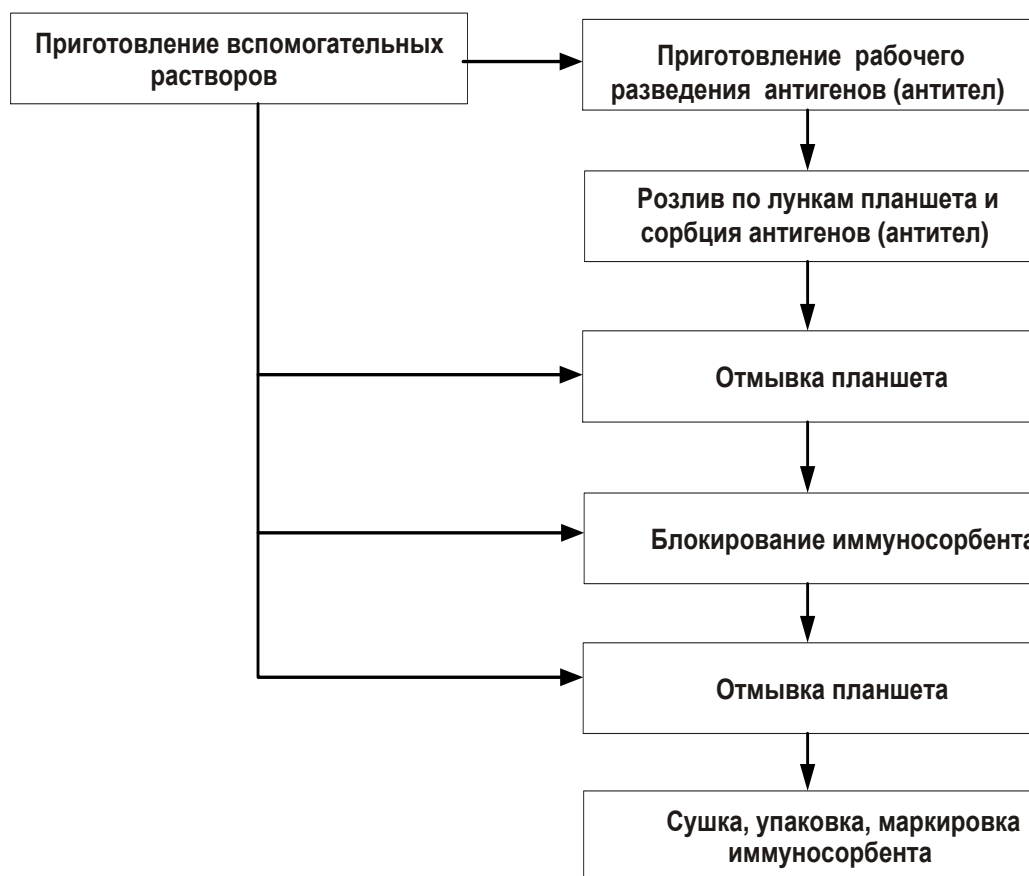


Рис. 106. Общая технологическая схема получения иммуносорбентов для ИФА.

Технологические схемы получения иммуносорбентов для конкретных ИФТС, описанные в соответствующих регламентах, могут отличаться от приведенной и количеством операций, и их содержанием.

Процесс начинается с приготовления вспомогательных растворов – это растворы для разведения антигенов (антител) перед их внесением в лунки планшета, растворы для отмывки планшетов, растворы для блокирования иммуносорбента.

Во многих случаях для разведения сорбируемого реагента используются карбонатно-бикарбонатный буферный раствор (КББ), т.е. водный раствор двух солей – двууглекислого натрия и кислого углекислого натрия.

#### Пример приготовления КББ

1. Готовят концентраты водных растворов натрия кислого углекислого ( $\text{NaHCO}_3$ ) и натрия углекислого ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
2. Из концентратов готовят необходимые объемы растворов обеих солей.

3. Раствор натрия углекислого добавляют в раствор натрия кислого углекислого под контролем рН (до рН 9,6).

КББ используется для разведения сорбируемого антигена или антитела, поскольку их препараты, используемые в производстве, – это, как правило, концентрированные продукты.

Их разведение (рабочее разведение), которое следует вносить в лунки планшета для обеспечения максимальной эффективности (чувствительности и специфичности) анализа, по причине неизбежной нестандартности сырья необходимо экспериментально определять для каждой новой серии его. Это определение, которое, по сути, является и входным контролем сырья, выполняется путем приготовления пробных иммуносорбентов, полученных с использованием ряда разведений антигена (антитела)-сырья, и их испытания в ИФА параллельно иммуносорбенту ранее принятой серии ИФТС (референс-серии).

Рабочее разведение антигенов (антител) вносится в лунки планшета либо вручную с помощью многоканальных автоматических пипеток (рис. 107), либо с помощью специального сорбционного комплекса (рис. 108).



Рис. 107. Многоканальный пипеточный дозатор Ленпипет Блэк.

Планшеты с разлитым по лункам рабочим раствором выдерживаются для сорбции антигена (антитела) на поверхности лунок определенное время при определенной температуре (продолжительность сорбции и ее температурный режим определяются для каждой ИФТС при ее разработке), после чего жидкость из лунок планшета удаляется и планшет промывается специальным раствором

для удаления не связавшейся с поверхностью лунок части сорбируемого реагента.

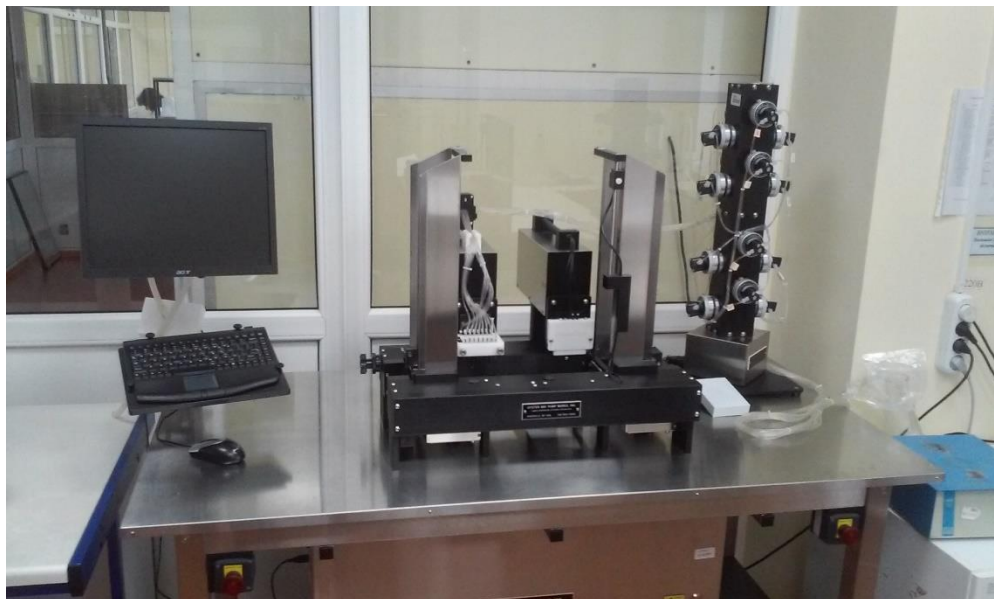


Рис. 108. Сорбционный комплекс

Эта операция также выполняется либо вручную, либо с использованием аппаратов для промывки планшетов (вошеров) (рис. 109) либо с использованием специального аспирационного комплекса (рис. 110). Кратность промывок также определяется специфическими особенностями сорбируемого реагента.

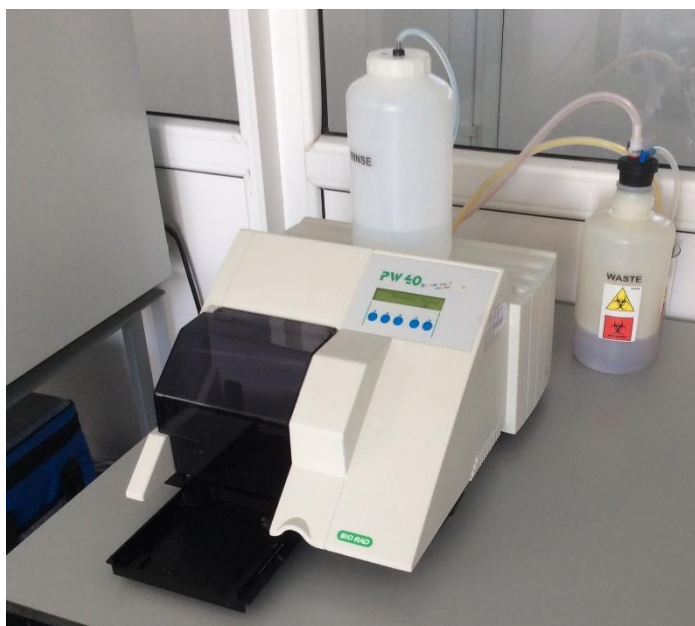


Рис. 109. Вошер

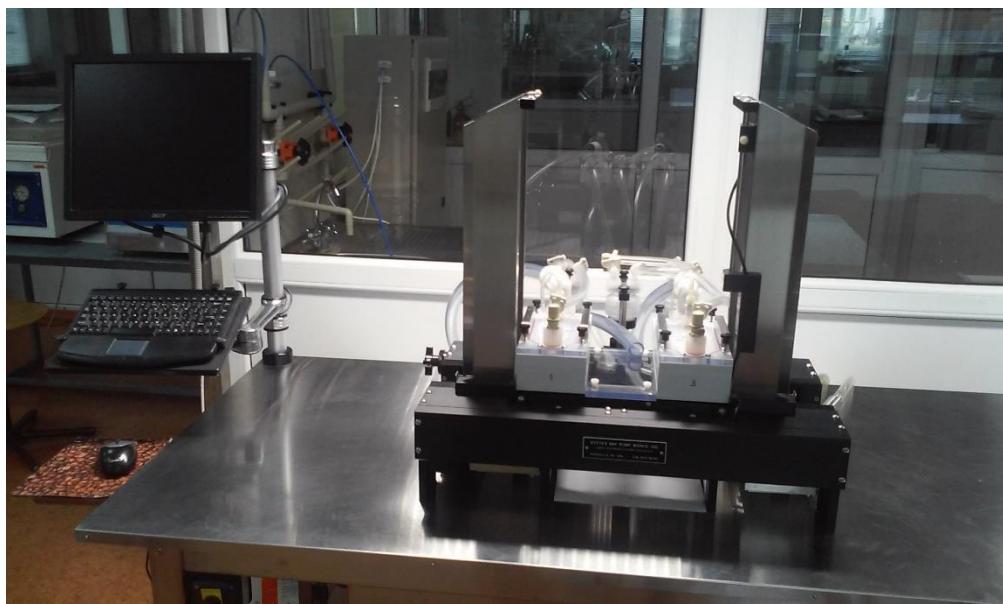


Рис. 110. Аспириционный комплекс

Для приготовления отмывающего раствора при получении иммуносорбентов может использоваться соответствующий концентрат промывочного раствора, входящий в состав большинства наборов, но чаще всего готовятся специальные промывочные растворы, составы и технологию которых отрабатывают в процессе разработки соответствующих ИФТС.

Пример приготовления промывочного раствора

Готовят концентрат фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ), для чего навески натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), натрия хлористого и мертиолята растворяют в воде очищенной, измеряют рН, при необходимости доводят его до 7,0-7,2; готовый концентрат фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Перед использованием концентрат разводят в 10 раз водой очищенной.

После промывки в лунки планшета вносится (также либо вручную, либо с помощью аспирационного комплекса) специальный блокирующий раствор (БР), понижающий вероятность развития неспецифических реакций. Состав блокирующего раствора и условия блокировки (температура, время) зависят от особенностей сорбированного реагента.

### Пример приготовления БР

В необходимый объем воды очищенной вносят навески натрия углекислого и азида натрия, перемешивают до полного растворения солей.

Вносят навеску сахарозы, перемешивают 30 мин.

Добавляют 10-кратный раствор казеина, вновь перемешивают.

Визуально контролируют наличие инородных взвесей в растворе. Если есть взвеси, раствор фильтруют через бумажные фильтры.

Проверяют рН, норма 11,1-11,5. Если рН раствора не соответствует данному значению, БР готовят заново.

После блокирования иммуносорбент вновь отмывается и передается на сушку – либо на воздухе в ламинарном шкафу, либо с помощью специального сушильного оборудования под вакуумом (рис. 111).



(1)



(2)

Рис. 111. Оборудование для сушки планшетов: (1) сушильная камера, (2) лиофилизатор DELTA.

Высушенный иммуносорбент упаковывается в специальные пакеты из алюминиевой фольги на полиэтиленовой основе (ламинат) или из полиэтиленовой пленки, в которые вкладываются пакетики с силикагелем. Пакеты с иммуносорбентом запаиваются под вакуумом (рис. 112) и маркируются – на них наклеиваются этикетки в соответствии с требованиями технических условий на набор, для которого произведен иммуносорбент .

Готовый иммуносорбент складывается в специальные кассеты и хранится до комплектации набора при температуре 2-8 °С.



Рис. 112. Запаечная машина.

Антигенные иммуносорбенты готовят либо с использованием нативных антигенов возбудителей, т.е. антигенов, полученных из культуры соответствующего микроорганизма, либо с использованием их рекомбинантных аналогов или синтетических пептидов. Соответствующие технологические процессы отличаются друг от друга только стадиями получения антигенов для сорбции.

Технология получения нативных антигенов в общем случае (рис. 113) складывается из культивирования возбудителя и обработки полученной культуры.

При получении антигенов вирусных возбудителей к этой схеме добавляются стадии, связанные с получением культур клеток, инфицированием их вирусами и получением лизата клеток, пораженных вирусом (рис. 114).

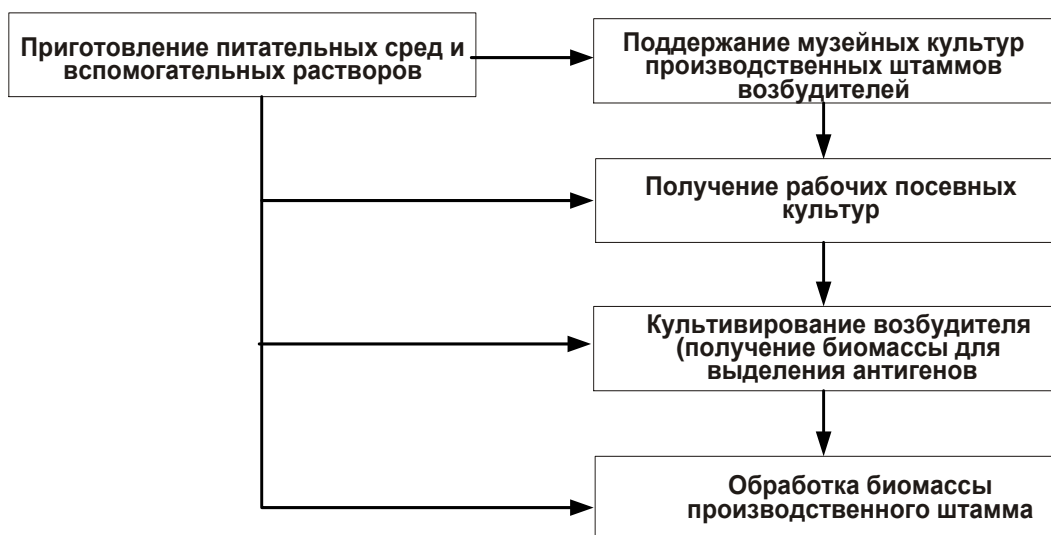


Рис. 113. Общая технологическая схема получения нативных антигенов.

Приготовление питательных сред – это либо подготовка к использованию уже готовых коммерческих питательных сред для культивирования бактерий или для выращивания культур клеток, которая проводится в соответствии с инструкциями по применению указанных сред с учетом особенностей культивируемых микроорганизмов или клеточных линий, либо приготовление таких сред по собственным прописям.

Наиболее ответственными из всех указанных стадий следует считать работу с музейными культурами производственных штаммов возбудителей и используемых клеточных линий. Содержанием работы на этих стадиях является поддержание эталонов производственных штаммов возбудителей и клеточных линий, хранящихся в музее предприятия в лиофилизированном или замороженном состоянии, и обеспечение производства качественными рабочими посевными культурами, т.е. культурами, которые используются уже для засева производственных объемов питательных сред или – в случае культивирования вирусов – для получения необходимой производственной серии культуры клеток и для ее инфицирования.

Последующее культивирование производственного штамма возбудителя обеспечивает получение необходимого количества подлежащей переработке биомассы – бактериальной культуры или инфицированной вирусом культуры клеток.



Режим культивирования – температура, продолжительность, характеристики получаемой биомассы определяются особенностями культивируемого возбудителя.



Рис. 114. Общая технологическая схема получения нативных вирусных антигенов (вирусных лизатов)

Полученную биомассу возбудителя далее подвергают переработке для освобождения видоспецифических антигенов возбудителя.

Бактериальную культуру инактивируют (прогреванием или введением соответствующих реагентов), последовательным центрифугированием-разведением осадка соответствующим вспомогательным раствором отмывают от остатков питательной среды и затем разрушают клетки физическими (обработка ультразвуком, последовательное замораживание-размораживание) или биохимическими (обработка лизирующими клетки реагентами) методами.

Культуру клеток, инфицированных вирусом, по достижении заданного цитопатического эффекта вначале подвергают действию реагентов, разрушающих монослой клеток, отмывают клетки соответствующим вспомогательным раствором и лизируют их однократным замораживанием-размораживанием и обработкой ультразвуком

Полученный лизат центрифугируют, супернатант при необходимости подвергают дополнительной очистке от балластных веществ.

Специфическую активность каждой новой серии лизата контролируют в ИФА с референс-серией соответствующей ИФТС, для чего готовят пробный иммуносорбент и проводят ИФА образцов, заведомо содержащих и не содержащих соответствующий анализ в параллельной постановке с пробным иммуносорбентом и иммуносорбентом референс-серии. Пробный иммуносорбент, как правило, готовят, используя несколько рабочих разведений лизата, которые выбирают, ориентируясь на рабочее разведение, использованное при выпуске референс-серии используемой ИФТС. Максимальное разведение лизата новой серии, использованное для приготовления пробного иммуносорбента, при котором результаты ИФА совпадают с результатами, полученными при использовании иммуносорбента референс-серии, принимают за рабочее разведение при использовании лизата в производстве.

Проконтролированный лизат используют затем для приготовления иммуносорбента по описанной выше методике.

*Пример получения лизатного антигена (лизатный антиген цитомегаловируса)*

1. Приготовление вспомогательных растворов

*1.1. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ)*

Вначале готовят концентрат этого раствора, для чего готовят навески натрия хлористого, калия хлористого, натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного, калия фосфорнокислого однозамещенного безводного, натрия азида

растворяют в воде очищенной в объеме около 2/3 от заданного объема концентрата; доводят объем раствора водой очищенной до заданного объема; измеряют рН (должен быть 7,3-7,6).

Для приготовления ФСБ концентрат разводят в 25 раз водой очищенной, измеряют рН (должен быть 7,2-7,4), стерилизуют в течение 20 мин при 121 °С.

### *1.2. Диссоциирующий раствор*

Состав: смесь равных объемов раствора трипсина и раствора Версена (коммерческие препараты).

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

### *1.3. Среда для замораживания посевных культур*

Непосредственно перед использованием в среду культивирования добавляют диметилсульфоксид и фетальную бычью сыворотку

## 2. Приготовление питательной среды

Среду готовят непосредственно в культуральных флаконах (матрацах) в асептических условиях, добавляя в коммерческую питательную среду RPMI-1640 фетальную сыворотку, раствор антибиотика-антимикотика и раствор глутамина.

## 3. Получение культур клеток

### 3.1. Подготовка посевного материала

Для получения вирусных лизатов используется перевиваемая культура клеток почечного эпителия африканской зеленой мартышки линии Rita Vero B (ViroImmune), эталон (музейная культура) которой хранится в замороженном состоянии при минус 70 °С. Из размороженной музейной культуры последовательным трехкратным пассированием на питательной среде готовятся посевные культуры, хранящиеся в замороженном состоянии и используемые для приготовления рабочих клеточных субкультур, которые уже заражаются вирусами.

#### 3.1.1. Культивирование клеток

Размораживают эталонную культуру или посевную культуру, для чего извлекают ампулу из среды азота, проверяют плотность прилегания крышки к горловине ампулы (при неплотном прилегании возможна контаминация клеточной

суспензии и/или взрыв за счет контакта воды с остатками жидкого азота) и переносят ампулу в водяную баню с температурой 37°C, выдерживают 2 мин, затем извлекают ампулу из водяной бани, обрабатывают снаружи дезраствором, переносят в ламинарный шкаф и по каплям вносят в нее 2,0 мл теплой питательной среды.

В размороженной культуре определяют концентрацию жизнеспособных клеток и их процент, для чего с помощью гемоцитометра в суспензии клеточной культуры, смешанной с равным объемом 0,4% раствора трипанового синего, подсчитывают число неокрашенных (живые) и окрашенных (мертвые) клеток. Исходя из результатов подсчета, рассчитывают объем размороженной культуры, обеспечивающий при засеве 1 матраца заданную посевную дозу.

Асептически вносят в матрацы с питательной средой размороженную культуру в рассчитанном объеме. Засеянные матрацы маркируют (название клеточной линии, дату посева, номер пассажа), размещают в термостате горизонтально и инкубируют при 37 °С в течение 5 сут.

### 3.1.2. Получение клеточной суспензии

По окончании инкубации просматривают культуральные сосуды под инвертированным микроскопом, отбирают матрацы с плотным клеточным монослоем (при контроле в инвертированном микроскопе 80-90 % поля зрения должно быть занято клетками). Вносят отобранные матрацы в ламинарный бокс, обрабатывают их поверхность раствором пурсепта, сливают из них питательную среду в емкость для сбора жидких отходов и асептически вносят в матрацы диссоциирующий раствор, предварительно выдержанный в течение 30 мин при 37 °С, размещают матрацы в термостате при 37 °С так, чтобы монослой был залит диссоциирующим раствором, и выдерживают в течение 2 мин. Полученную клеточную суспензию асептически разливают по стерильным центрифужным пробиркам, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 сек (время центрифугирования без учета времени разгона и остановки центрифуги), удаляют

супернатант в сосуд для жидких отходов, осадок клеток суспендируют в питательной среде, внося асептически в каждую пробирку по 6,0 мл среды, предварительно выдержанной 30 мин при 37 °С .

В полученной суспензии клеток определяют их концентрацию, подсчетом в гемоцитометре. Исходя из полученной концентрации, рассчитывают объем суспензии, необходимый для засева матраца следующего пассажа. Полученную клеточную суспензию используют для получения клеточной культуры второго пассажа, клеточную суспензию, полученную после второго пассажа, используют для получения клеточной культуры третьего пассажа.

3.1.3. Получение рабочих субкультур для заражения вирусами и посевных культур для хранения в замороженном состоянии

Клеточная культура третьего пассажа со сформированным клеточным монослоем, прошедшая контроль его плотности, может быть использована либо как рабочая субкультура для последующего инфицирования, либо из нее готовится клеточная суспензия для проведения следующего пассажа по описанной выше методике или для последующего хранения в замороженном состоянии (посевные культуры).

Для последующего хранения в замороженном состоянии используют культуру третьего пассажа, содержащую не менее 95 % живых клеток. После трипсинизации клеток их центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляют, клеточный осадок отделяют от пробирки легким потряхиванием, а затем добавляют в каждую пробирку по 5,0 мл охлажденной до 4°С среды для замораживания, перемешивают пипетированием. После перемешивания суспензию клеток разливают по 0,5 мл в специальные криопробирки, криопробирки выдерживают 1 ч при минус 20 °С, затем – 3 ч при минус 40 °С, затем оставляют на ночь при минус 70 °С, после чего помещают в сосуды Дюара с жидким азотом.

#### 4. Инфицирование клеточных культур

##### 4.1. Подготовка вирусных культур

Для инфицирования рабочих субкультур клеток используются культуры штамма AD-169 – лабораторный адаптированный штамм ЦМВ.

Эталонные культуры штамма хранятся в жидком азоте. В производстве они, как правило, используются однократно - для получения рабочих культур, хранящихся в тех же условиях.

Эталонную (рабочую) культуру штамма размораживают при комнатной температуре. Исходя из ее паспортных характеристик (вирусного титра) и производственного задания, рассчитывают объем посевного инокулята или посевной дозы (объем цельной вирусной культуры, содержащий количество вируса, необходимое для инфицирования культуры клеток в одном матрасе) и общий объем вирусной культуры, необходимый для заражения заданного числа матрасов с культурой клеток. Рассчитанный объем вирусной культуры асептически разводят ростовой питательной средой из расчета 20 мл среды на один посевной инокулят.

#### 4.2. Заражение культуры клеток

По 20 мл полученной вирусосодержащей жидкости вносят в каждый матрас с культурой клеток; выдерживают матрасы 30 мин при 37 °С, удаляют из матрасов всю жидкость и вносят по 20 мл свежей ростовой среды, матрасы инкубируют 2 сут при 37 °С, после чего под микроскопом оценивают эффект заражения - цитопатическое действие вируса, выражаемое процентом клеток с дегенеративными изменениями. Для последующего использования отбирают матрасы с поражением не менее 90% клеток.

#### 5. Получение вирусного лизата

Удаляют из отобранных матрасов ростовую среду и вносят в каждый матрас по 10,0 мл ФСБ. Помещают матрасы в морозильник на минус 40 °С и выдерживают 3-5 ч (до полного замерзания - контроль визуальный), после чего размораживают при комнатной температуре, сливают содержимое матрасов в стерильные центрифужные пробирки и обрабатывают ультразвуком в течение 2 мин, после чего центрифугируют вирусосодержащую жидкость при 8000 об/мин и температуре 3-5 °С.

#### 6. Контроль качества вирусного лизата (определение титра вируса)

В полученном супернатанте (вирусном лизате определяют титр вируса по эффекту заражения культуры клеток его последовательными 10-кратными разведениями).

При производстве антигенных иммуносорбентов помимо нативных антигенов широко используются их рекомбинантные аналоги, но технология их получения – это предмет, связанный с проблемами генетики и молекулярной биологии, и ей предполагается посвятить специальное пособие.

#### *2.5.6.2.2. Приготовление контрольных образцов*

Вторым обязательным специфическим компонентом любой ИФТС являются контрольные образцы: контрольный положительный образец ( $K^+$ ) – реагент, заведомо содержащий аналит, выявляемый в исследуемых образцах, и контрольный отрицательный образец ( $K^-$ ) – реагент, не содержащий этот аналит (либо содержащий его в концентрациях, не определяемых используемым методом).

Основное назначение этих реагентов – контроль правильности проведения исследования, т.е. правильности выполнения всех операций подготовки и постановки ИФА, указанных в инструкции по применению набора.

Если ИФТС предназначена для оценки только наличия или отсутствия аналита в исследуемых образцах (качественная оценка), в наборах обычно используется единичный  $K^+$ . Если же ИФТС предназначена для оценки содержания (концентрации или титра) аналита, в наборы включают не менее двух  $K^+$  с известным содержанием выявляемого аналита. Они при этом выполняют функции калибровочных проб.

Поскольку интенсивность цветной реакции и, соответственно, значение ОП реакционной смеси зависят от содержания (концентрации или титра) аналита, значения ОП в лунках с такими  $K^+$  могут быть использованы для построения калибровочного графика, с помощью которого затем уже по значениям ОП в лунках с исследуемыми образцами оценивается содержание в них аналита.

Характер зависимости ОП от содержания аналита и, соответственно, формат калибровочного графика оценивается экспериментально при разработке соответствующего набора. Чаще всего удается аппроксимировать эту зависимость уравнением прямолинейной (прямо пропорциональной) зависимости  $y=ax+b$ , где  $y$  – величина, отражающая содержание аналита (концентрация или титр аналита или их логарифм, конкретный характер этой величины определяется в предварительных исследованиях);  $x$  – значение ОП;  $a$  и  $b$  – коэффициенты уравнения. В этом случае в наборе достаточно двух  $K^+$  с известным содержанием аналита (обычно это крайние значения диапазона, в котором сохраняется указанная зависимость). В противном случае число  $K^+$  может быть увеличено до 4-6.

Сырьем для приготовления контрольных образцов служит плазма или сыворотка крови человека, полученная, как правило, либо на станциях переливания крови, где она по каким-либо причинам не может быть использована по своему прямому назначению, либо в иных лечебно-профилактических учреждениях.

Сырье, отбираемое для производства, проходит предварительный контроль на наличие в нем антител к вирусам иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1, ВИЧ-2), антигена  $P24$  ВИЧ-1, антител к вирусу гепатита  $C$  (ВГС), антигена вируса гепатита  $B$  ( $HBsAg$ ), а также иных маркеров инфекционной и неинфекционной патологии, если соответствующая ИФТС предназначена для их выявления.

Для последующего использования отбирается сырье, как содержащее, так и не содержащее аналит, для выявления которого предназначается соответствующая ИФТС, и не содержащее прочих указанных выше маркеров. Первое может быть использовано только для приготовления  $K^+$ , второе пригодно как для приготовления  $K^-$ , так и для использования в качестве основы для приготовления  $K^+$ .

Типовая схема получения  $K^+$  и  $K^-$  из отобранного сырья приведена на рис. 115.

$K^+$  при этом готовится либо из положительного по наличию выявляемого аналита сырья, которое, как правило, дополнительно разводится до нужного со-



держания аналита специальными вспомогательными растворами или отрицательным по содержанию аналита сырьем (степень этого разведения определяется экспериментально), либо из отрицательного по содержанию аналита сырья, в которое добавляется необходимое (также определяемое экспериментально) количество высокотитражной по указанному аналиту сыворотки.  $K^-$  получают из соответствующего сырья, разводя его, как правило, специальным вспомогательным раствором.

Готовые  $K^-$  и  $K^+$  затем контролируются в ИФА для оценки их соответствия требованиям ТУ, разливаются по флаконам, флаконы укупориваются, маркируются, готовые реагенты проходят еще один контроль в ИФА и передаются на комплектацию набора.

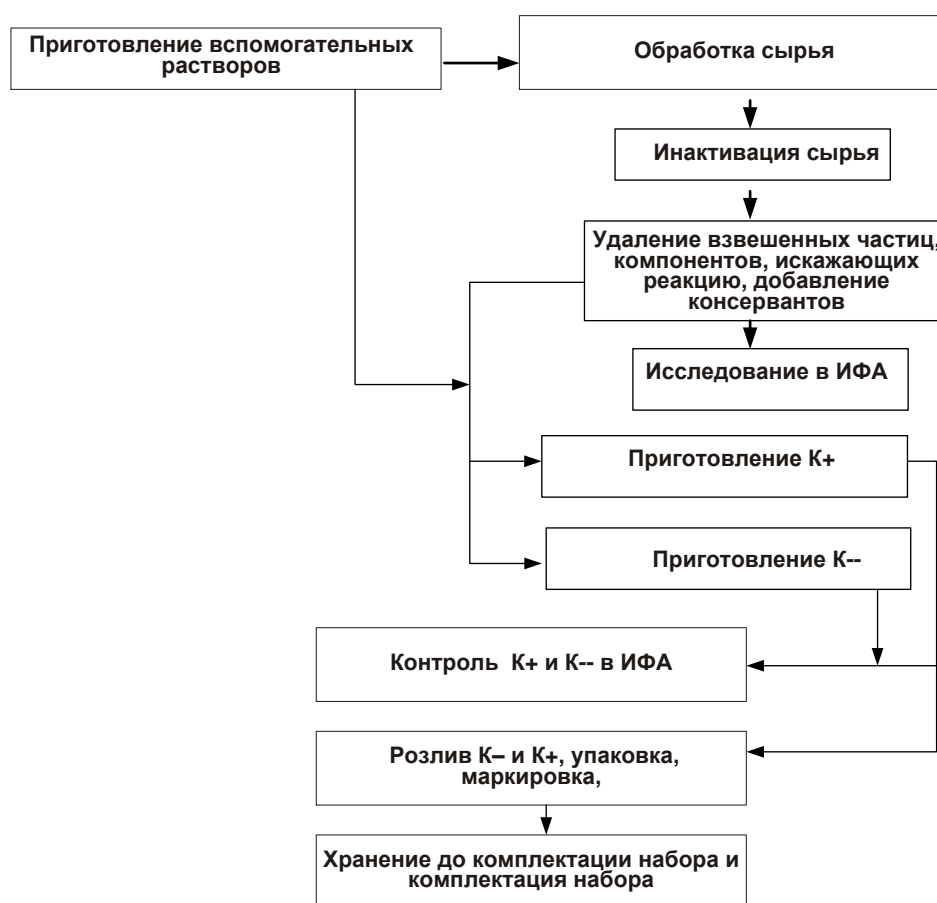


Рис. 115. Типовая схема получения контрольных образцов для комплектации ИФТС

## Пример приготовления контрольных образцов ( $K^+AT$ и $K^-$ ) для ИФТС

### "АГАТ-ВИЧ-1,2"

#### 1. Приготовление вспомогательных растворов

1.1. Готовят водный раствор ципрофлоксацина гидрохлорида, для чего навеску ципрофлоксацина гидрохлорида растворяют в воде очищенной.

1.2. Готовят фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР), для чего навески натрия фосфорнокислого 2-замещенного 12-водного, натрия фосфорнокислого 1-замещенного 2-водного, натрия хлорида, необходимые объемы 10% раствора азиды натрия и 1% раствора ципрофлоксацина гидрохлорида растворяют в воде очищенной.

1.3. Готовят буферный раствор для разведения сыворотки (БРРС), для чего необходимый объем ФСБ-Тх25 и навески казеина, натрия хлорида и натрия азиды растворяют в воде очищенной.

#### 1.4. Контроль в ИФА

ФСБР и БРРС исследуют в ИФА – используя референс-серию ИФТС "АГАТ-ВИЧ-1,2", оценивают значения ОП в лунках с ними.

Растворы считают пригодными, если значение ОП в лунках ФСБР и БРРС не превышает  $ОП_{крит}$ .

#### 2. Обработка сырья

##### 2.1. Инактивация сырья

В качестве сырья используют сыворотку (плазму), не содержащую *HBsAg* и антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и ВГС. До использования сырье может храниться в замороженном состоянии.

Замороженное сырье размораживают при комнатной температуре и переливают в чистые термостойкие флаконы. Флаконы помещают в водяную баню при 56 °С и выдерживают в течение 2 ч. Прогретое сырье охлаждают до комнатной температуры.

##### 2.2. Центрифугирование сырья. Добавление консервантов

Инактивированное сырье центрифугируют со скоростью 8000 об/мин, при температуре 8-10°С в течение 60 мин. Через ватно-марлевый фильтр переливают

супернатант из центрифужных стаканов в колбу или бутылку для приготовления растворов. Замеряют объем полученного супернатанта и вносят в него консервант – 10 % раствор азиды натрия в объеме, необходимом для получения конечной концентрации азиды натрия в супернатанте, равной 0,1%.

### 2.3. Исследование сырья в ИФА, фильтрация

Для определения возможности дальнейшего использования инактивированного сырья его исследуют в ИФА с референс-серией ИФТС "АГАТ-ВИЧ-1,2" в соответствии с инструкцией по применению набора.

Сырье, давшее ОП больше 3,50, используют далее, как "положительную" сыворотку для приготовления  $K^+_{AT}$ , сырье, давшее ОП, равную или меньшую  $ОП_{крит}$ , используют далее, как "отрицательную" сыворотку для приготовления  $K^-$  и основы для  $K^+_{AT}$ , все остальное сырье используют только для приготовления основы для  $K^+_{AT}$ .

Проводят фильтрацию всего инактивированного сырья через мембранные фильтры, используя предфильтр с диаметром пор 0,45 мкм и фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

### 3. Приготовление $K^+_{AT}$

В смесь ФСБР с сывороткой, имеющей  $3,50 > ОП > ОП_{крит}$ , вносят сыворотку с ОП  $> 3,50$  и феноловый красный.

### 4. Приготовление $K^-$

Смешивают БРРС и обработанное сырье.

### 5. Контроль в ИФА

Новые серии  $K^+_{AT}$  и  $K^-$  контролируют в ИФА в ИФТС "АГАТ-ВИЧ-1,2", используя их как исследуемые образцы в соответствии с требованиями инструкции по применению набора. Новые серии реагентов считают пригодными для использования, если ОП в лунках с ними соответствует нормативам ТУ на набор.

### 6. Розлив $K^-$ и $K^+_{AT}$ , упаковка, маркировка, контроль в ИФА

Проводят розлив  $K^-$  и  $K^+_{AT}$  по флаконам, укупорку и маркировку флаконов в соответствии с требованиями ТУ на набор.

Разлитые по флаконам, укупоренные и маркированные реагенты контролируют в ИФА.

Флаконы с  $K^-$  и  $K^+_{AT}$  складывают в маркированные контейнеры и передают на хранение до комплектации тест-системы.

7. Хранение до комплектации набора До использования при комплектации ИФТС реагенты хранят при 2-8 °С.

#### *2.5.6.2.3. Приготовление конъюгатов*

Как уже говорилось, в состав любой ИФТС обязательно входит конъюгат – иммунохимически активный реагент, "меченый" ферментом.

В зависимости от формата ИФА иммунохимически активным реагентом, в принципе, может быть как специфический антиген, так и антитела к нему. Однако, разнообразие свойств и строения антигенов не позволяет разработать единую методику получения антигенных конъюгатов, что существенно ограничивает возможности их использования. В этой связи более технологичным является получение антительных конъюгатов, при чем в качестве иммунохимической компоненты чаще всего используются антитела к человеческим иммуноглобулинам. Указанные антитела получают либо из крови лабораторных животных, иммунизированных очищенными человеческими иммуноглобулинами (поликлональные антитела), либо посредством гибридомных технологий (моноклональные антитела).

#### *Получение поликлональных антител к человеческим IgG*

##### 1. Получение гипериммунной сыворотки

Козлов иммунизируют коммерческим препаратом человеческих IgG по следующей схеме:

I неделя

3 мг IgG в 2,0 мл физиологического раствора смешивают с 2,0 мл адьюванта Фрейнда и вводят под кожу спины по 1,0 мл в четырех точках.

II неделя

5 мг *IgG* в 2,0 мл физиологического раствора смешивают с 2,0 мл адьюванта Фрейнда и вводят внутримышечно.

III неделя

7 мг *IgG* в 2,0 мл физиологического раствора смешивают с 2,0 мл адьюванта Фрейнда и вводят внутримышечно.

Через 2 недели проводят пробное кровопускание (10 мл крови), контролируют полученную сыворотку методом преципитации в геле по Оухтерлони.

Через 1 месяц после контроля проводят стимуляцию, для чего 10 мг *IgG* разводят в 0,5 мл физиологического раствора, смешивают с 1,5 мл адьюванта Фрейнда и вводят внутримышечно.

Через 2 недели после стимуляции проводят очередное пробное кровопускание (10 мл крови), определяют титр анти-*IgG* (должен быть 1:16 или выше), на следующий день выполняют забор 750-1000 мл крови и через неделю повторяют забор крови.

Из полученной гипериммунной сыворотки выделяют анти-*IgG*.

## 2. Выделение анти-*IgG*.

К 100 мл гипериммунной сыворотки добавляют 50 мл насыщенного раствора сульфата аммония, тщательно перемешивают пластмассовой или стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 30 мин, после чего центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин. Сливают супернатант. Осадок растворяют в 50 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора. К полученному раствору добавляют 25 мл насыщенного раствора сульфата аммония, тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин. Сливают супернатант, осадок растворяют в 50 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора.

Полученный раствор анти-*IgG* диализуют в фосфатном буферном растворе (48 ч при 2-8 °С). По окончании диализа при необходимости раствор иммуноглобулинов центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин.

Измеряют объем полученного раствора и вносят в него азид натрия из расчета 0,1 г азид натрия на 100 мл раствора. При необходимости разливают по флаконам и маркируют флаконы в соответствии с установленным порядком.

Хранят раствор анти-IgG до использования при 2-8 °С не более 1 года.

Конъюгирование антигенов или антител с ферментом может быть выполнено разными методами – химической сшивкой, ковалентным связыванием или иммунохимически, но чаще всего используются различные реакции ковалентного связывания, когда молекула фермента вводится в молекулу антигена или антитела с помощью таких реагентов, как периодат натрия, глутаровый альдегид и др.

В качестве ферментной "метки" чаще всего используется пероксидаза корня хрена, могут использоваться также щелочная фосфатаза и β-галактозидаза *Escherichia coli*.

При всем разнообразии методов получения конъюгатов можно сформулировать общие основные требования к ним:

- должна сохраняться специфическая активность фермента и иммунохимической компоненты конъюгата;
- конъюгат должен легко выделяться из реакционной смеси при использовании соответствующих методов очистки;
- выход конъюгата должен быть достаточно высоким;
- конъюгат должен быть определенного состава;
- конъюгат должен быть стабилен при хранении.

В наибольшей степени всем этим требованиям на сегодня отвечает периодатный метод получения конъюгатов антител с пероксидазой хрена (метод Накане). Суть его – в модификации фермента, аминокислотные группы которого предварительно блокированы, периодатом натрия, окисляющим углеводные компоненты фермента с образованием активных альдегидных групп, реагирующих затем с аминокислотными группами антител.

Поскольку термин "конъюгат" относится как к сырью, из которого готовится соответствующий реагент набора, так и к самому этому реагенту, во избежание терминологической путаницы в последующем тексте указанные позиции будут именоваться "конъюгатом-сырьем" и "конъюгатом-реагентом".

*Получение конъюгата-сырья на основе антител (классов IgM или IgG) периодатным методом по Накане*

1. Раствор антител с концентрацией не менее 5 мг/мл ставят на диализ против 0,05М карбонат-бикарбонатного буферного раствора (КББ) с рН 9,5-9,6.

2. В водный раствор пероксида добавляют свежеприготовленный раствор периодата натрия и оставляют на 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Затем ставят на диализ против 0,001М ацетатного буферного раствора.

3. Диализ проводят не менее 18 ч, меняют буферный раствор не менее 3 раз, объем буферного раствора не менее 2 л.

4. После диализа доводят рН раствора пероксидазы до 9,5-9,6 с помощью 1М КББ.

5. Смешивают антитела с пероксидазой и оставляют на 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте.

6. Добавляют свежеприготовленный 5М раствор цианобромгидрида натрия, оставляют на 2 ч в холодильнике.

7. Добавляют 1М раствор этаноламина, оставляют на 30 мин в холодильнике.

8. Очистку конъюгата от несвязавшихся антител и пероксидазы проводят на колонке, заполненной сефакрилом S300. Рабочий объем колонки 200 мл, диаметр 15 мм, элюент 0,01М ФСБ, скорость 1 мл/мин, сбор фракций по 2 мл. Конъюгат выходит с первым пиком (второй пик – несвязанные антитела, третий пик – несвязанная пероксидаза).

Типовая технологическая схема получения конъюгата-реагента представлена на рис. 116.



Рис. 116. Типовая технологическая схема получения конъюгата-реагента

Конъюгат-реагент, входящий в состав ИФТС, может быть как готовым к применению ("конъюгат-реагент готовый к применению"), так и требовать предварительного разведения специальным разводящим раствором ("конъюгат-реагент-концентрат").

Как следует из схемы, получение конъюгата-реагента начинается с приготовления вспомогательных растворов и определения активности сырья.

В качестве вспомогательных растворов при этом могут использоваться коммерческие стабилизирующие растворы, например, такие как стабилизирующий раствор 15197 (HRP-stabilPLUS) и стабилизирующий буфер для антител 1577 (Antibody Enhancer) фирмы Kem-En-Tek (США), используемые как по отдельности, так и в различных смесях. Либо стабилизирующие растворы готовятся непосредственно на производстве.

Активность конъюгата-сырья оценивается путем выбора оптимального соотношения "сырье-раствор для его разведения", т.е. такого разведения, которое обеспечивает максимальную эффективность (чувствительность и специфичность) анализа. Для этого готовится ряд пробных разведений, при их выборе, как правило, ориентируются на разведение сырья, использованное при выпуске предыдущей серии (референс-серии) соответствующей ИФТС. Затем эти проб-



ные разведения используются в ИФА параллельно конъюгату-реагенту референс-серии при исследовании ряда образцов, предварительно охарактеризованных по содержанию соответствующего анализата. Оптимальным признается максимальное разведение конъюгата-сырья, при котором оценки исследуемых образцов соответствуют их предварительно определенным характеристикам и в наибольшей степени совпадают с оценками, полученными с использованием референс-серии конъюгата-реагента. Указанная оценка, как и в случае оценки новой серии антигена для иммуносорбента, одновременно служит входным контролем новой серии конъюгата-сырья.

Соответственно полученной оценке активности конъюгата-сырья из него готовят конъюгат-реагент, разливают реагент по флаконам, укупоривают и маркируют флаконы в соответствии с требованиями ТУ на ИФТС, для которой он готовится. В ходе этих операций (непосредственно после приготовления новой серии конъюгата-реагента и после его розлива, маркировки и укупорки флаконов) реагент контролируют в ИФА с использованием референс-серии ИФТС, для которой он готовится.

Технологические схемы приготовления конъюгатов-реагентов для конкретных ИФТС могут отличаться от приведенной типовой. Так, если активность конъюгата-сырья известна, соответствующая операция не выполняется; возможны и другие отличия.

#### *Приготовление конъюгата-1-реагента для ИФТС "АГАТ-ВИЧ-1,2"*

##### 1. Определение оптимального разведения конъюгата-1-сырья

Готовят пробные разведения биотинилированных пептидов ВИЧ-1, ВИЧ-1 гр. О и ВИЧ-2 и биотинилированных антител моноклональных к р24 ВИЧ-1 в стабилизирующем растворе HRP-StabilPLUS (фирма «Kem-En-Tec»).

Каждое пробное разведение испытывают в ИФА с референс-серией "АГАТ-ВИЧ-1,2" параллельно конъюгату-1-реагенту референс-серии при исследовании сывороток стандартных панелей, содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антиген р24 к ВИЧ-1, а также сывороток доноров, полученных из СПК.

ИФА проводят в соответствии с требованиями инструкции по применению набора.

## 2. Приготовление конъюгата-1-реагента

Исходя из установленного рабочего разведения, рассчитывают объемы сырья и стабилизатора, необходимые для приготовления заданного объема реагента. В рассчитанный объем стабилизирующего раствора вносят рассчитанные объемы сырья (биотинилированных пептидов ВИЧ-1 и ВИЧ-2, также биотинилированных моноклональных антител к р24), добавляют раствор метиленового синего, перемешивают и выдерживают 2-3 ч при комнатной температуре.

## 3. Контроль в ИФА

Пригодность полученной серии реагента проверяют в ИФА с референс-серией ИФТС "АГАТ-ВИЧ-1,2" при исследовании сывороток стандартных панелей, содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, а также антиген ВИЧ-1, в соответствии с требованиями инструкции по применению набора, используя новую серию конъюгата-1 параллельно с конъюгатом-1 референс-серии.

## 4. Розлив, упаковка, маркировка, контроль в ИФА

Разливают конъюгат-реагент-1 по флаконам, укупоривают и маркируют флаконы. Разлитый по флаконам, укупоренный и маркированный реагент контролируют в ИФА.

Флаконы с конъюгатом-реагентом-1 складывают в маркированный контейнер и передают на хранение до комплектации тест-системы.

## 5. Хранение до комплектации набора

До использования при комплектации ИФТС реагент хранят при 2-8 °С

### *Приготовление конъюгата-реагента для ИФТС "ИФА-НВsAg"*

1. Готовят разводящий буферный раствор, для чего навески хепес *Na*, натрия хлорида, аргинина монохлорида, плюроники *F-68*, сахарозы, бренидокса, фенола и необходимые объемы фетальной сыворотки, сыворотки крови крупного рогатого скота, асцитической жидкости, 1% раствора калия железосинеродистого

растворяют в воде очищенной. Контролируют рН, при необходимости корректируют рН, фильтруют полученный раствор через фильтр из стекловолокна, вносят в емкость навеску фенола, перемешивают 20-30 мин.

2. Готовят конъюгат-реагент, для чего конъюгат-сырье и МАВ-33-IgG/IgG-Polymer растворяют в разводящем буферном растворе.

Количества компонентов, необходимые для получения заданного объема конъюгата-реагента, вносят в емкость соответствующей вместимости, перемешивают на магнитной мешалке 20-30 мин.

### 3. Контроль в ИФА

Приготовленный конъюгат контролируют в ИФА с референс-серией ИФТС "ИФА-НВsAg" в соответствии с требованиями ТУ на ИФТС (Раздел "Методы испытаний", подраздел "Определение чувствительности и специфичности"), используя контролируемый конъюгат параллельно с конъюгатом референс-серии.

### 4. Розлив, упаковка, маркировка, контроль в ИФА

Разливают конъюгат по флаконам, укупоривают и маркируют флаконы.

Разлитый по флаконам, укупоренный и маркированный реагент контролируют в ИФА.

Флаконы с конъюгатом складывают в маркированный контейнер и передают на хранение до комплектации тест-системы.

### 5. Хранение до комплектации набора

До использования при комплектации ИФТС реагент хранят при 2-8 °С

\*\*\*

В ряде ИФТС, которые кроме выявления соответствующего анализата предназначены также для исследований, подтверждающих его наличие в образце при постановке ИФА конкурентным методом, к трем названным специфическим компонентам набора добавляется еще один – раствор подтверждающего агента (РПА).

### ***2.5.6.3. Приготовление вспомогательных (неспецифических) реагентов***

В каждую ИФТС, помимо специфических реагентов, определяющих назначение набора, входят реагенты, обеспечивающие саму возможность и/или удобство постановки ИФА.

В число обязательных для каждой ИФТС входят промывочный раствор, субстратный раствор с индикатором (или его компоненты) и стоп-реагент (реагент, останавливающий цветную реакцию).

В качестве промывочного раствора чаще всего используется фосфатно-солевой буферный раствор с твином, но в ряде случаев более оптимальным считается трис-солевой буферный раствор с твином. Эти растворы могут быть универсальными в производстве если не для всех ИФТС, то для достаточно больших групп наборов.

Поскольку в постановке ИФА отмывка лунок планшета выполняется, как правило, неоднократно, необходимый для этого объем промывочного раствора достаточно велик, и поэтому для комплектации наборов обычно используется концентрат такого раствора, который перед проведением анализа разводится в необходимых количествах очищенной водой.

Вторым обязательным компонентом ИФТС из числа неспецифических реагентов является субстратный раствор, т.е. раствор субстрата, который ферментируется используемой в системе "меткой". Для пероксидазы, таким субстратом служит перекись водорода. Поскольку сама по себе ферментация перекиси водорода в ходе постановки внешне практически ничем не проявляется, в реакционной среде должен присутствовать также хромоген, т.е. индикатор этой реакции, меняющий цветность среды. Обычно для этого используют тетраметилбензидин (ТМБ). Он может входить в состав субстратного раствора, который в таком случае именуется субстратно-индикаторным или просто индикаторным раствором, но может использоваться и как самостоятельный реагент.

Приведенные составы ЦБР, ТМБ и РИ могут использоваться в производстве как отдельных наименований ИФТС, так и их групп, что, очевидно, требует

соответствующей экспериментальной проработки при организации соответствующих производств.

Последним обязательным неспецифическим реагентом в составе ИФТС является стоп-реагент, в качестве которого, как правило, используется 0,5 моль/л раствор серной кислоты.

Помимо названных, в зависимости от назначения ИФТС, формата и особенностей постановки ИФА, в состав набора могут входить также раствор для разведения антигена (РРА), растворы для разведения образцов (РРО), растворы для разведения конъюгата (РРК), растворы для разведения образцов и конъюгата (РРОК). Составы неспецифических реагентов даже одного наименования (и, соответственно, назначения) могут существенно различаться, хотя возможно и полное совпадение составов различных по назначению реагентов. Это, естественно, требует предварительной экспериментальной проработки состава каждого реагента при организации производства новых ИФТС.

Технология приготовления всех неспецифических реагентов практически однотипна (рис. 117).

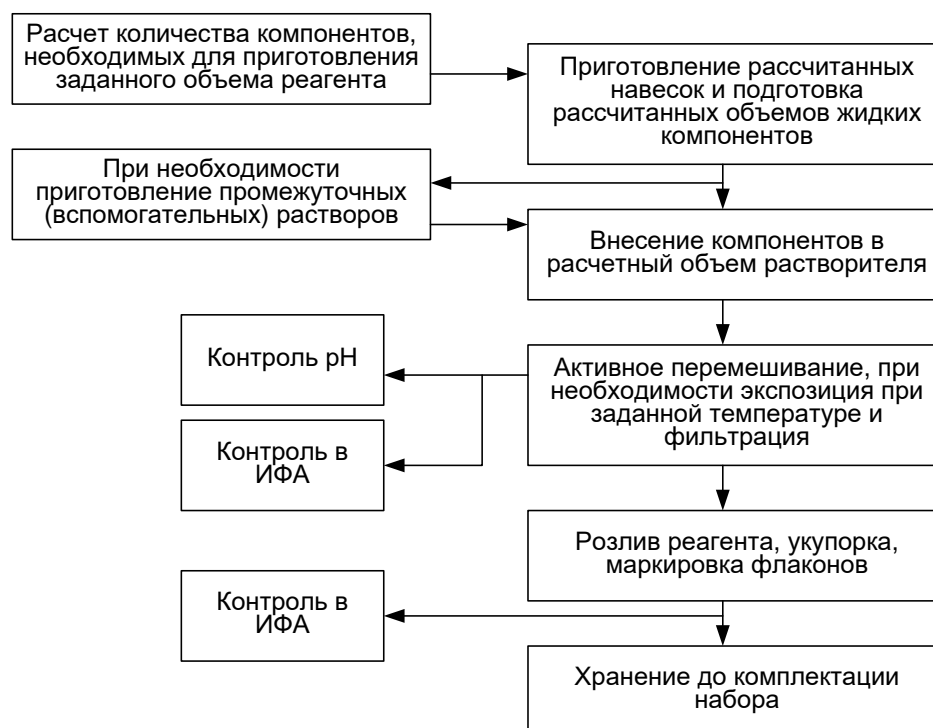


Рис. 117. Общая технологическая схема приготовления неспецифических реагентов ИФТС

Исходя из прописи реагента и производственного задания, рассчитывается количество (масса или объем) каждого компонента, необходимое для приготовления заданного объема реагента. Затем готовятся рассчитанные навески солей и прочих сухих реагентов, подготавливаются рассчитанные объемы жидких реагентов, при необходимости готовятся промежуточные (вспомогательные растворы). В емкость необходимой вместимости в зависимости от состава реагента вносится либо весь рассчитанный объем растворителя, либо какая-то его часть, вносятся компоненты реагента, ведется активное перемешивание (как правило, на магнитной мешалке) до полного растворения всех компонентов. При необходимости полученный раствор выдерживается определенное время при определенной температуре и фильтруется. Контролируется его рН и пригодность его для использования постановкой ИФА с референс-серией соответствующей ИФТС с использованием вновь приготовленного реагента параллельно такому же реагенту референс-серии.

При положительных результатах контроля реагент передается на розлив по флаконам, укупорку и маркировку флаконов; маркированный реагент вновь контролируется в ИФА и при положительном результате контроля передается на временное хранение до комплектации набора.

Технологическая схема получения конкретных вспомогательных реагентов для конкретных ИФТС, естественно, может отличаться от приведенной типовой – усложняться и детализоваться, поскольку приготовление столь многокомпонентных растворов может потребовать определенной последовательности внесения и определенных методических особенностей растворения отдельных компонентов, определяемых в предварительных экспериментальных исследованиях при разработке новых ИФТС и освоении технологии их производства.

### **2.5.7. Производство наборов для иммунного блоттинга**

Как уже отмечено в разделе 2.2.2.4, метод иммунного блоттинга (ИБ), т.е. выявление и оценка содержания в исследуемых образцах антител к отдельным антигенам патогена является фактическим развитием ИФА. Поскольку по ходу

патологического процесса спектр специфических антител в крови пациента меняется, оценка динамики этого спектра позволяет не только подтвердить наличие у пациента соответствующего патологического процесса, но и определить его стадию, т.е. дает информацию, необходимую как для постановки окончательного диагноза, так и для выбора наиболее эффективных лечебно-профилактических мероприятий.

Состав реагентов, входящих в наборы для обоих форматов ИБ, в общем случае одинаков:

- иммуносорбент,
- контрольные образцы (не всегда),
- конъюгат (концентрат или готовый к применению),
- концентрат промывочного раствора,
- раствор для разведения образцов и раствор для разведения конъюгата (оба эти раствора могут быть также объединены в один – в раствор для разведения образцов и конъюгата),
- окрашивающий раствор.

Как и в наборах для ИФА, реагенты, входящие в состав наборов для ИБ, можно разделить на основные (специфические) – иммуносорбент, контрольные образцы и конъюгат и вспомогательные (неспецифические) – концентрат промывочного раствора, раствор для разведения образцов и конъюгата, окрашивающий раствор.

При таком сходстве в составе наборов для обоих форматов ИБ и практически одинаковом внешнем виде их основного реагента – иммуносорбента технология его приготовления принципиально различна.

### ***2.5.7.1. Приготовление иммуносорбентов для ИБ в формате Western-blot***

Иммуносорбент для ИБ в формате Western-blot – это стрипы, приготовленные из нитроцеллюлозной мембраны, на которую методом электропереноса

нанесены отдельные фракции лизата патогена, на которые он разделен в процессе электрофореза.

Соответственно, технологическая схема приготовления этого иммуносорбента в общем случае (рис. 118) включает получение лизата, нанесение его на поверхность полиакриламидного геля (рис. 119), электрофоретическое разделение его в полиакриламидном геле на белковые фракции, соответствующие отдельным антигенам (рис. 120), электроперенос этих фракций с геля на нитроцеллюлозную мембрану (рис. 121), дополнение перенесенного спектра линией контроля реакции, блокировку иммуносорбента в виде цельных мембран, их нарезку на стрипы и заключительные операции маркировки, упаковки, хранения до комплектации и передачи на комплектацию набора. Технология получения лизатов, в общем случае, аналогична технологии получения лизатов для производства ИФТС. Принципиально различаются лишь последующие операции приготовления самих иммуносорбентов.

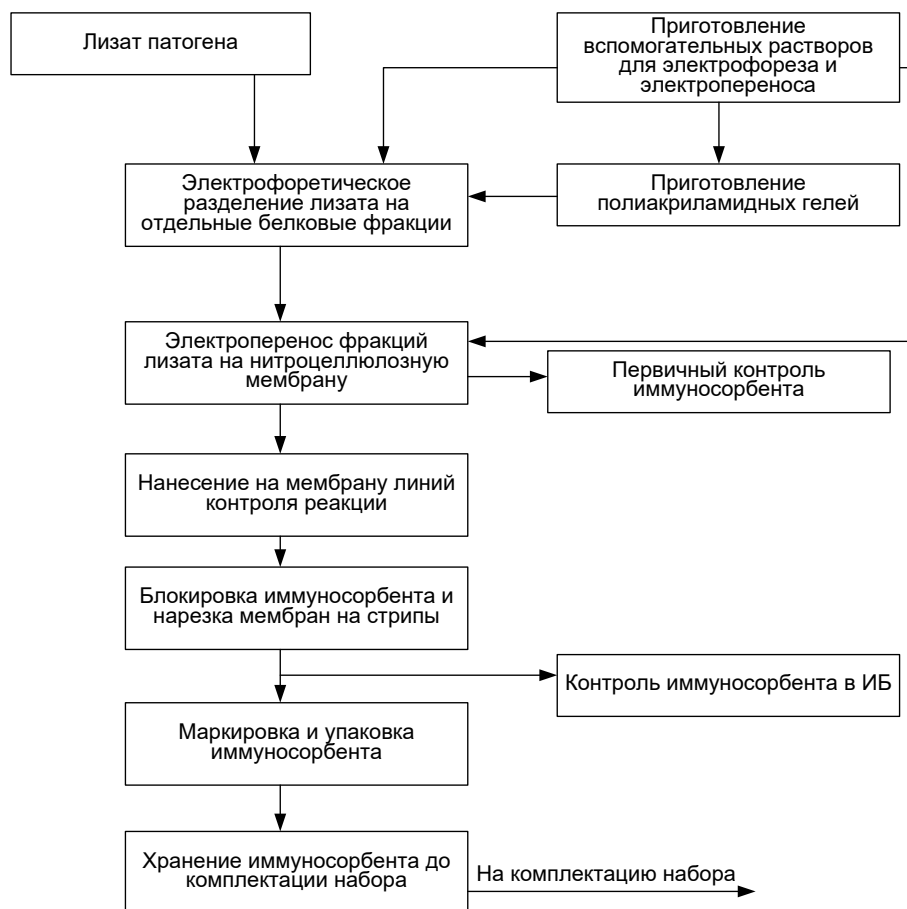


Рис. 118. Типовая схема получения иммуносорбента для ИБ в формате Westernblot.



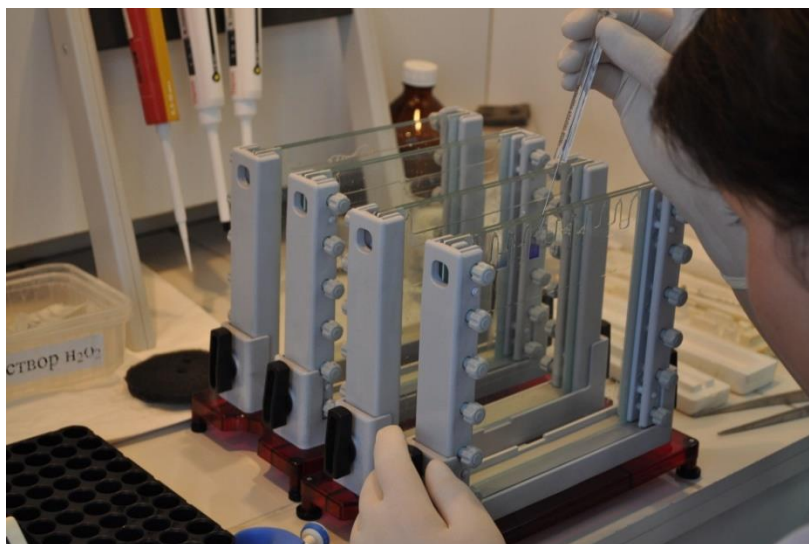


Рис. 119. Нанесение антигена на поверхность полиакриламидного геля.

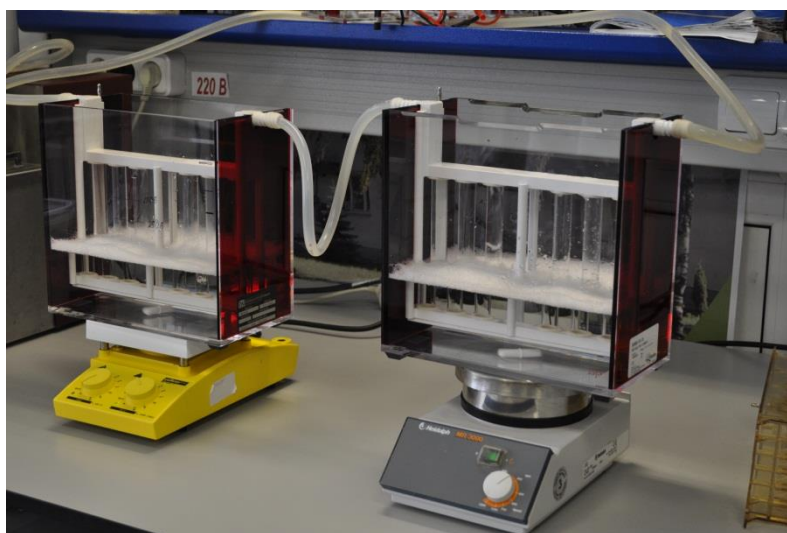


Рис. 120. Камера для электрофореза



Рис. 121. Проведение электропереноса

В качестве примера получения иммуносорбента для ИБ в формате Western-blot можно привести технологию получения иммуносорбента для тест-системы "ИФА-Блот-ВИЧ-1".

*Технология получения иммуносорбента для ИФТС "ИФА-Блот-ВИЧ-1"*

*1. Растворы для электрофореза и электропереноса*

*1.1. Трис-солянокислый буферный раствор (ТБР-1) с концентрацией трис-(оксиметил)-аминометана 1,25 моль/л.*

*1.2. Трис-солянокислый буферный раствор (ТБР-2) с концентрацией трис-(оксиметил)-аминометана 0,5 моль/л.*

*1.3 10% водный раствор додецилсульфата натрия (SDS).*

*1.4. Диссоциирующий буферный раствор (ДБР)*

Состав: вода очищенная, ТБР-2, 10% раствор додецилсульфата натрия, глицерин, 0,5 % раствор бромфенолового синего.

*1.5. 30% раствор акриламида/бис-акриламида*

Состав: акриламид, бисакриламид, вода очищенная.

*1.6. 10% раствор персульфата аммония (APS)*

*1.7. 10-кратный концентрат электродного буферного раствора*

Состав: трис-(оксиметил)-аминометан, глицин, додецилсульфат натрия, вода очищенная.

*1.8. Раствор для окраски мембраны*

Состав: краситель Пунцовый S, 3 % раствор трихлоруксусной кислоты.

*1.10. 10-кратный концентрат буферного раствора для электропереноса*

Состав: трис-(оксиметил)-аминометан, глицин, вода очищенная.

*1.11. Буферный раствор для электропереноса*

Состав: 10-кратный концентрат буферного раствора, метанол, вода очищенная.

*1.12. Раствор сыворотки диагностической моноспецифической против IgG человека (Анти- IgG)*

Содержимое ампулы с лиофилизированной сывороткой разводят в 1 мл воды очищенной, 0,1 мл регидратированной сыворотки разводят в 6,0 мл карбонат-бикарбонатного буферного раствора с красителем Пунцовым S (0,001 г красителя на 10 мл КББ).

## *2. Получение иммуносорбента*

### *2.1. Приготовление полиакриламидных гелей (ПААГ)*

В соответствии с инструкцией производителя готовят установку для заливки ПААГ.

Готовят раствор для полимеризации нижней фазы ПААГ, для чего в необходимое число бакпечаток (в зависимости от количества получаемых гелей) вносят в каждую:

- воду очищенную,
- 30 % раствор акриламида/бисакриламида,
- ТБР-1,
- 10% раствор додецилсульфата натрия,
- глицерин.

К полученным смесям добавляют N,N,N'N'-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) и APS.

Раствор поочередно из каждой бакпечатки (1 бакпечатка на 1 гель) переливают в прибор для формирования геля. В него помещают магнит для перемешивания.

Конец отводной трубки прибора для формирования геля соединяют шлангом с перистальтическим насосом, устанавливают регулятором скорости необходимый режим работы. Включают мешалку, открывают кран отводной трубки прибора для формирования геля и, включив насос, производят заливку нижней фазы ПААГ между стеклами столика. Сверху наслаивают 1,0 мл воды очищенной. Оставляют ПААГ полимеризоваться на 4-5 ч при температуре 18-22°C.

Через 4-5 ч после заливки нижней фазы ПААГ готовят раствор для полимеризации верхней фазы ПААГ, для чего в необходимое число бакпечаток (в зависимости от количества получаемых гелей) вносят в каждую:

- воду очищенную,
- 30% раствор акриламида/бисакриламида,
- ТБР-2,
- 10% раствор додецилсульфата натрия.

К полученным смесям добавляют ТЕМЕД и APS.

Полученный раствор верхней фазы наносят поверх нижней фазы ПААГ. В заполненные камеры вставляют спейсеры таким образом, чтобы на поверхности не образовывались пузырьки. Растворы выдерживают в камере 16-18 ч при температуре 18-24 °С. Визуально контролируют качество полученных ПААГ. Не пригодными для использования считаются незаполимеризовавшиеся смеси и гели с наличием пузырьков воздуха и/или неровностями поверхности (ямки, бороздки). делать записи в маршрутной карте.

## 2.2. Приготовление рабочего раствора антигенов ВИЧ-1

Используется вирусный лизат ВИЧ-1 и гликопротеиновые добавки gp160, gp120.

Рассчитывается объем лизата, необходимый для приготовления рабочего раствора антигенов, исходя из следующих условий:

- загрузка лизата осуществляется из расчета 1 мкг на 1 мм<sup>2</sup> ПААГ;
- площадь ПААГ – 130 мм<sup>2</sup>;

Объем лизата, необходимый для загрузки одного ПААГ, определяется по формуле

$$V = \frac{m}{c},$$

где  $V$  - необходимый объем лизата, мл;

$m$  - общая загрузка поверхности ПААГ, мг (в заданных условиях 0,13 мг);

$c$  - концентрация белка в лизате (паспортная характеристика), мг/мл.

В микропробирки типа Эппендорф (1 микропробирка на 1 гель) вносят в каждую:

- необходимый объем лизата ВИЧ-1;
- ДБР;

- 2-меркаптоэтанол.

Пробирки с рабочим раствором антигенов помещают в водяную баню при 95-100°C и выдерживают в течение 4 мин.

### *2.3. Проведение электрофореза*

Готовят буферный раствор для электрофореза. Извлекают спейсеры из камер с гелями. Очищают образовавшиеся карманы от остатков геля при помощи фильтровальной бумаги. В полученные карманы вносят буферный раствор для электрофореза. Затем вносят в них рабочий раствор антигенов из микропробирок.

Собирают камеру для проведения электрофореза, в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Заливают буферный раствор для электрофореза в нижнюю и верхнюю части камеры. Ставят камеру на магнитную мешалку и включают ее.

Подключают камеру для электрофореза к охлаждающей циркуляционной бане и включают циркуляционную баню в режим охлаждения.

Прибор для электрофореза подключают к источнику постоянного тока. Электрофорез проводят при температуре 6-8°C. Рабочее напряжение в начале процесса 100 В. Через 30-40 мин напряжение увеличивают до 150 В, еще через 60 мин – до 250 В. Электрофорез останавливают после того, как фронт бромфенолового синего достигнет нижнего края ПААГ или совсем выйдет из него.

### *2.4. Проведение электропереноса*

В камеру для проведения электропереноса вносят буферный раствор для электропереноса.

Извлекают гели из камер электрофореза и помещают в лотки с буферным раствором для электропереноса.

К камере электропереноса подключают охлаждающую циркуляционную водяную баню. Температура охлаждающей жидкости 14-16°C.

На нитроцеллюлозных мембранах помещают карандашом рабочую поверхность, помещают мембраны рабочей поверхностью вверх в лотки с буферным раствором для электропереноса и выдерживают в течение 30 мин.

Собирают "сэндвичи" «гель-мембрана», используя бумагу для блоттинга или фильтровальную бумагу и спонжи, входящие в комплект кассеты для электропереноса. Для этого в раскрытую кассету для электропереноса кладут спонж, смоченный в буфере для электропереноса, на него кладут 2 листа бумаги для блоттинга, также смоченные в буфере для электропереноса, следом кладут смоченный лист нитроцеллюлозной мембраны, а на мембрану – гель. Гель должен быть уложен на мембрану с учетом различия их размеров так, чтобы центр геля был по возможности ближе к центру мембраны, а края мембраны, не покрытые гелем, были примерно одинаковой ширины. Следует обратить внимание на недопустимость наличия воздушных пузырьков между гелем и мембраной. Для устранения воздушных пузырьков вдоль геля прокатывают стеклянную палочку, смоченную буферным раствором для электропереноса. Поверх геля кладут 1 лист бумаги для блоттинга, смоченный в буферном растворе для электропереноса, еще раз прокатывают стеклянной палочкой, накрывают спонжем, входящим в комплект камеры для электропереноса, смоченным в буферном растворе для электропереноса. Закрывают кассету, фиксируют ее канцелярскими резинками с двух сторон. Собранный блок-"сэндвич" помещают в одну из ячеек камеры для электропереноса, ориентируя мембрану в сторону анода.

Прибор для электропереноса подключают к источнику питания в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Процесс электрофоретического переноса белковых комплексов проводят при напряжении 100 В в течение 3 ч.

### *2.5. Первичный контроль иммуносорбента*

По окончании переноса "сэндвичи" разбирают, мембраны помещают на 1-2 мин в раствор для окраски мембраны. После этого мембраны тщательно промывают очищенной водой и подсушивают на фильтровальной бумаге рабочей стороной вверх.

Визуально оценивают наличие окрашенных зон и их горизонтальность. Участки (обычно на краю переноса), где горизонтальность нарушена, для приготовления стрипов не используют. Мембраны, на которых после окрашивания не проявились белковые зоны, а также мембраны с наличием разводов, заминов и

следов воздушных пузырей между гелем и мембраной при электропереносе (брак укладки геля) не используют.

Обрезают непрокрашенные боковые части мембраны.

#### *2.6. Нанесение линии контроля реакции*

Линию контроля реакции наносят на мембрану перьевой авторучкой, заполненной раствором анти-IgG человека, для чего подсушенную мембрану размещают на фильтровальной бумаге рабочей поверхностью вверх так, чтобы края бумаги выступали за края мембраны, и, отступив от ее нижнего края 6 мм, проводят по линейке линию контроля реакции, начиная с листа фильтровальной бумаги, плавно переходя на мембрану и заканчивая снова на листе фильтровальной бумаги.

#### *2.7. Блокировка и нарезка иммуносорбента*

Готовят блокирующий раствор, для чего концентрат трис-солевого буферного раствора разводят в 10 раз водой очищенной.

Отмечают карандашом верхнюю окрашенную поверхность мембран и поочередно помещают каждую мембрану в индивидуальный лоток с блокирующим раствором. Выдерживают в нем при покачивании на шейкере в течение 10-15 мин при 18-25 °С, после чего отмывают водой очищенной в том же лотке на шейкере 3 раза по 5 мин (мембраны в процессе блокировки обесцвечиваются).

Отмытые мембраны подсушивают на фильтровальной бумаге рабочей поверхностью вверх и с помощью специального резака надрезают их таким образом, чтобы остался неразрезанным верхний край мембраны, который не был покрыт гелем. Каждую мембрану помещают в отдельный конверт из фильтровальной бумаги, конверты нумеруют соответственно номерам комплектов стрипов, которые будут получены из каждой мембраны.

#### *2.8. Контроль иммуносорбента в ИБ*

Качество стрипов, полученных из каждой мембраны, контролируют в ИБ с использованием реагентов референс-серии набора (кроме ее иммуносорбента и конъюгата) при исследовании  $K^+$  и  $K^-$  референс-серии или иных образцов, ранее

охарактеризованных в ИБ и аналогичных  $K^+$  и  $K^-$  по содержанию и спектру антигенов ВИЧ-1. Для контроля используют краевые стрипы, полученные из каждой мембраны

Пригодными для последующего использования считают мембраны, на краевых стрипах которых при исследовании образцов, заведомо содержащих антитела к ВИЧ-1, наличие окрашенных зон антигенов ВИЧ-1 полностью соответствует результатам предварительного исследования этих образцов в ИБ, а на краевых стрипах, использованных для исследования образцов, заведомо не содержащих антитела к ВИЧ-1, отсутствуют любые окрашенные зоны, кроме зоны линии контроля реакции.

### *2.9. Изготовление фотографий референс-стрипов*

Краевые стрипы, с которыми исследовался  $K^+$  и на которых присутствуют окрашенные зоны, соответствующие всему спектру белков ВИЧ-1, считают референс-стрипами соответствующих мембран. Их сканируют и совмещают каждое сканированное изображение со специальным шаблоном. На каждом шаблоне указывают номер мембраны, к которой относится референс-стрип, (операцию выполняют в любом доступном графическом редакторе). Распечатывают полученные фотографии.

### *2.10. Маркировка и упаковка стрипов, маркировка и упаковка иммуносорбента.*

Непосредственно перед комплектованием серии наборов, исходя из номера комплекта набора и объема серии, составляют серию иммуносорбента.

Стрипы выбранных иммуносорбентов маркируют, используя самоклеющуюся пленку с нанесенной на нее нумерацией, после чего разрезают мембраны и промаркированные стрипы помещают в пластиковые пробирки с навинчиваемыми крышками. На каждую пробирку наклеивают этикетку с указанием сведений, требуемых ТУ на набор, и индивидуальным номером иммуносорбента.

Каждую пробирку иммуносорбента и соответствующую ему фотографию референс-стрипа вкладывают в полиэтиленовый пакет типа zip-lock размером 10x15 см.



## *2.11. Хранение иммуносорбента до комплектации*

До комплектации набора пакеты с иммуносорбентом и референс-стрипами хранят при температуре 2-8 °С.

### **2.5.7.2. Приготовление иммуносорбентов для ИБ в формате Line-blot**

Иммуносорбент для ИБ в формате Line-blot – это также стрипы, приготовленные из нитроцеллюлозной мембраны, на которую специальным устройством (например, с помощью машины фирмы BioDot, рис. 122) нанесены полосы растворов отдельных антигенов патогенного агента (как правило, синтетические или рекомбинантные, т.к. получение препаратов отдельных антигенов из соответствующих лизатов – процедура достаточно сложная и затратная).

Соответственно, технологическая схема приготовления иммуносорбентов для ИБ в формате Line-blot (рис. 123) в общем случае включает получение антигенов-сырья, подготовку мембран, определение оптимального разведения антигенов-сырья и приготовление рабочих разведений антигенов, нанесение рабочих разведений антигенов на мембраны, а затем, как и в случае Westernblot, – блокировку иммуносорбента, его сушку, нарезку стрипов, контроль иммуносорбента в ИБ, упаковку и маркировку, хранение до комплектации набора.



Рис. 122. Машина фирмы BioDot для нанесения полос антигенов на мембрану

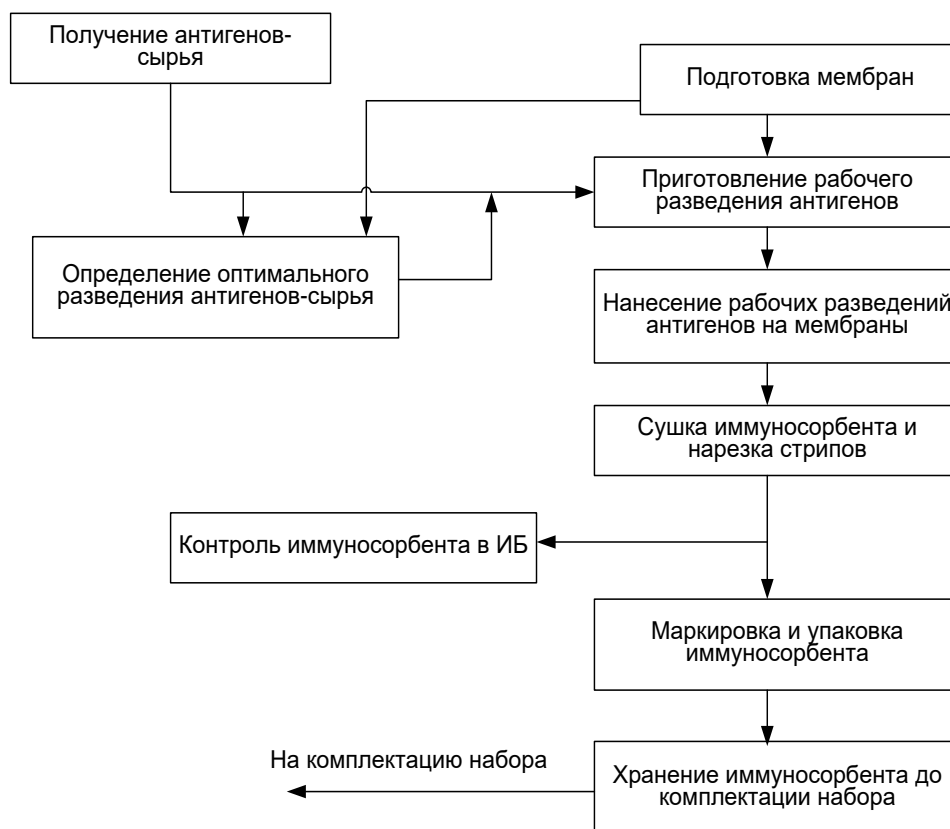


Рис. 123. Типовая технологическая схема приготовления иммуносорбента для ИБ в формате Line-blot

Рекомбинантные или синтетические антигены-сырье получают по тем же технологиям, что и для ИФА. В качестве примера их последующего использования при производстве иммуносорбента для ИБ в формате Line-blot приведено описание технологического процесса приготовления иммуносорбента для тест-системы "Лайн-Блот ВИЧ-1".

#### *Приготовление иммуносорбента для тест-системы "Лайн-Блот ВИЧ-1"*

Иммуносорбент (стрипы из нитроцеллюлозной мембраны) готовят непосредственным нанесением рекомбинантных аналогов антигенов ВИЧ-1,2, ВИЧ-1 группы О и контрольных линий на нитроцеллюлозную мембрану.

##### *1. Подготовка мембран*

Из рулона нитроцеллюлозной мембраны нарезают необходимое число мембран размером 10x17 см. Маркируют каждую мембрану в правом и левом верхних углах.

Готовят необходимый объем ФСБ с учетом расхода 50 мл ФСБ на 1 мембрану. Заливают его в лотки, помещают в них мембраны рабочей поверхностью вверх. Лотки выдерживают на шейкере 15-25 мин при 40 об/мин при температуре 18-24 °С, после чего извлекают мембраны, выкладывают их на листы фильтровальной бумаги и сушат при 18-24 °С 1,5-2 ч на рабочем столе либо в течение 30-45 мин при 18-24 °С в ламинарном шкафу.

## *2. Определение оптимального разведения антигенов (выбор рабочей концентрации антигенов)*

Для определения оптимального разведения антигенов (определение одновременно является входным контролем антигенов-сырья) по технологии, изложенной ниже, готовят пробные иммуносорбенты, используя ряд разведений антигенов-сырья, из которых одно должно совпадать с разведением, использованным для приготовления иммуносорбента предыдущей серии (референс-серии) набора, а остальные готовят путем титрования в сторону увеличения и уменьшения его концентрации с одинаковым шагом.

Проводят ИБ сывороток стандартных панелей, содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ (стандартные панели предприятия или коммерческие аналоги) и сывороток доноров, полученных из СПК и давших в реакции ИФА в скрининговом или подтверждающем тесте отрицательный результат, в тест-системе "Лайн-Блот-ВИЧ-1,2", используя стрипы пробных иммуносорбентов параллельно с иммуносорбентом референс-серии.

Оптимальными разведениями антигенов считают те, в которых результаты ИБ полностью совпадают с результатами ИБ при использовании иммуносорбента референс-серии и оценки исследованных образцов соответствуют их паспортным характеристикам.

Если для какого-либо из антигенов не удастся выбрать оптимальное разведение для сорбции, всю процедуру его входного контроля проводят еще раз. При повторении предыдущего результата данный антиген бракуется и делается запрос производителю на поставку другой серии этого антигена.

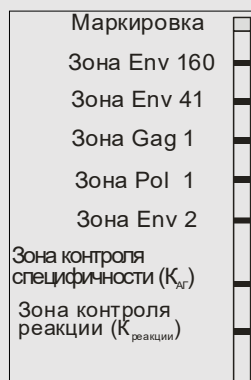
## *3. Приготовление рабочих разведений антигенов*

Исходя из производственного задания и выбранной при контроле каждого антигена рабочей концентрации белка, рассчитывают объем КББ и количество каждого антигена, необходимые для приготовления заданных объемов рабочих разведений.

Рабочие разведения готовят непосредственно перед сорбцией.

#### 4. Нанесение рабочих разведений антигенов и контрольных линий на мембрану

При ручном нанесении заполняют рабочими разведениями соответствующие маркеры или авторучки и по линейке наносят полосы этих разведений в соответствии со стандартной схемой нанесения антигенов ВИЧ и контролей:



*зона Env160- антиген (gp 120+gp41) ВИЧ-1*

*зона Env41-антиген (gp41) ВИЧ-1*

*зона Gag1- антиген (p24+p17) ВИЧ-1*

*зона Pol- антиген pol ВИЧ-1*

*зона Env2- антиген gp36 ВИЧ-2*

*зона  $K_{AG}$ - антигена специфичности*

*зона  $K_{реакции}$ - диагностическая сыворотка, содержащая иммуноглобулин IgG человека.*

Для каждого антигена и контрольных линий используют индивидуальный маркер (авторучку).

При нанесении с использованием машины BioDot подготовленные мембраны выкладывают на рабочую панель машины вдоль каждого борта по 2 шт. от стартовой точки и прижимают магнитами. В меню машины выбирают соответствующую программу нанесения линий.

### *5. Сорбция*

Мембраны с нанесенными на них антигенами выдерживают при температуре 2-8 °С (поз. Т-2) в течение 18-24 ч.

### *6. Блокировка иммуносорбента*

Готовят блокирующий раствор (БР) следующего состава: БСА, ФСБ<sub>x10</sub>, вода очищенная.

Наливают БР в полиэтиленовый лоток и помещают в него мембраны с нанесенными антигенами. Выдерживают 55-65 мин на шейкере при 40 об/мин температуре 18-24 °С, после чего отмывают мембраны от БР водой очищенной до полного исчезновения пены на их поверхностях.

### *7. Сушка иммуносорбента и нарезка стрипов*

Для предварительного удаления влаги отмытые мембраны помещают на 5 мин на сложенные вдвое листы фильтровальной бумаги при температуре 18-24 °С. Надрезают каждую мембрану полосками шириной 3 мм. Надрезанные мембраны сушат в ламинарном шкафу 3-3,5 ч при 18-24 °С на фильтровальной бумаге. Используя липкую ленту с нанесенными на нее порядковыми номерами, маркируют стрипы, после чего разрезают мембрану полностью.

### *8. Контроль иммуносорбента в ИБ*

Каждую новую серию иммуносорбента контролируют в ИБ, используя ее параллельно иммуносорбенту референс-серии при исследовании сывороток стандартных панелей, содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ-1,2, и сывороток доноров, полученных из СПК.

### *9. Упаковка и маркировка иммуносорбента*

Стрипы помещают в пластиковые пробирки с навинчиваемыми крышками. На каждую пробирку наклеивают этикетку с указанием сведений, требуемых ТУ на набор.

### *10. Хранение иммуносорбента*

До комплектации набора иммуносорбент хранят при температуре 2-8 °С.

### ***2.5.7.3. Подготовка контрольных образцов, конъюгатов, неспецифических реагентов***

Технология приготовления контрольных образцов и конъюгатов для ИБ в обоих форматах принципиально не отличается от технологии приготовления этих реагентов для ИФА, хотя возможны различия в отдельных методических приемах и технологии выполнения отдельных операций и их элементов, отрабатываемых в ходе соответствующих экспериментальных исследований для каждого конкретного набора.

В число неспецифических реагентов для ИБ в обоих форматах в общем случае входят:

- концентрат промывочного раствора,
- раствор для разведения образцов,
- раствор для разведения конъюгата,
- хромоген (окрашивающий раствор).

В ряде тест-систем растворы для разведения образцов и конъюгата объединены в раствор для разведения образцов и конъюгата. В отличие от тест-систем для ИФА в наборы для ИБ не входит стоп-реагент – цветную реакцию останавливают, промывая стрипы после экспозиции с хромогеном водой очищенной или промывочным раствором и водой очищенной.

Технология приготовления вспомогательных растворов для ИБ принципиально не отличается от технологии приготовления соответствующих реагентов для ИФА. Но конкретные составы указанных реагентов и особенности технологии их получения для конкретных наборов, естественно, могут иметь отличия и должны уточняться в экспериментальных исследованиях при разработке новых тест-систем и освоении их производства.

### **2.5.8. Производство наборов для иммунохроматографического анализа**

В состав набора для ИХА входит описанный в пункте 2.2.2.4.2 пластиковый картридж (кассета). Отдельно в состав набора, как правило, входит буферный раствор во флаконе-капельнице, остальные вспомогательные реагенты комплектуются в зависимости от типа теста. Это могут быть тампоны-зонды (для взятия назофарингеального мазка), пластиковая пипетка, ланцет, спиртовая салфетка (для тестирования крови, сыворотки и плазмы пациента). Такая комплектация позволяет использовать тест не только в условиях диагностических лабораторий, но и во внелабораторных условиях, в том числе для самотестирования, если это предполагается производителем.

Пластиковые картриджи, как и нитроцеллюлозная мембрана, полоски которой вставляются в картриджи – этокупаемый производителем материал, а все производства различных наборов для ИХА, как и для ИБ в формате Line-blot, будут отличаться друг от друга только технологиями получения реагентов, наносимых на мембрану. И поскольку спектр таких реагентов ничем не ограничен, достаточно сложно как-то обобщить описания этих технологий в данном пособии.

### **2.5.9. Технический контроль в производстве наборов реагентов**

Судьба каждого предприятия, в том числе производящего  $МИ_{ивд}$ , определяется уровнем его конкурентоспособности, который в основном определяется качеством продукции и ее стоимостью.

Что же такое качество продукции, в частности качество  $МИ_{ивд}$ ?

В общем случае качество любой продукции – это совокупность характеристик, которые определяют способность продукции удовлетворять те потребности, для которых она производится. Качество, очевидно, характеризует меру потребительской стоимости, степень ее пригодности и полезности.

Назначение любого  $МИ_{ивд}$  – оценка наличия/отсутствия и/или содержания в исследуемой пробе конкретного аналита (соединения или объекта) с помощью соответствующего метода исследования, и качество  $МИ_{ивд}$  – это, следовательно,

его способность обеспечивать указанную оценку при использовании в соответствии с ИП.

Качество любого продукта оценивается по совокупности показателей качества – конкретных характеристик продукта, прямо или косвенно отражающих его соответствие своему назначению. Очевидно, что среди этих характеристик есть такие, которые отражают сам факт пригодности продукта для использования по целевому назначению (основные показатели качества), и те, которые отражают удобство такого использования для потребителя (потребительские характеристики продукта). Для МИ<sub>ивд</sub> основными показателями качества являются их чувствительность и специфичность при выявлении соответствующего анализа, все прочие показатели качества являются скорее потребительскими характеристиками.

Качество продукции формируется на всех стадиях технологического процесса, начиная от оценки пригодности сырья и материалов, которыми располагает предприятие для ее производства, и кончая условиями хранения готовой продукции до ее отправки потребителю. А применительно к большинству МИ<sub>ивд</sub> их качество зависит также от условий транспортировки до потребителя и условий хранения уже у потребителя до использования по назначению. Поэтому качество продукции обеспечивается совместной деятельностью всех структурных подразделений, служб и отделов предприятия.

Система управления качеством продукции представляет собой организационную структуру, четко распределяющую ответственность, процедуры, процессы и ресурсы, необходимые для управления качеством. Важное место в этой системе занимает служба управления качеством, основными задачами которой являются: защита репутации предприятия; защита потребителя от дефектной продукции; сокращение объема непроизводственных работ; предупреждение брака; участие в разработке новой продукции и технологических процессов.

Организационно служба управления качеством продукции может быть построена по-разному – в зависимости от особенностей конкретного предприятия. На производствах МИ<sub>ивд</sub> она нередко представлена двумя отделами – отделом



биолого-технического контроля (ОБТК) и отделом обеспечения качества (ООК), подчиняющихся директору по качеству.

Основным инструментом обеспечения качества продукции является технический контроль, т.е. система мероприятий, в результате которых идентифицируется качество сырья и материалов, полуфабрикатов (промежуточных продуктов производства) и готовой продукции, а также правильность выполнения всех технологических операций.

Технический контроль решает следующие задачи:

- предупреждение влияния случайных и субъективных факторов на качество выпускаемой продукции;
- проверка соблюдения в технической документации требований международных, республиканских, отраслевых и ведомственных стандартов;
- обеспечение соблюдения заданного технологического режима;
- установление требуемого качества готовой продукции.

Решением всех этих задач занимается служба технического контроля, в которую организационно могут входить ОБТК, центральная заводская лаборатория (ЦЗЛ), лаборатории цехов, группы контроля и т.п., подчиняющиеся директору по качеству или непосредственно директору предприятия. Конкретная организационная схема службы, разумеется, определяется особенностями конкретного производства, но в любом случае основную роль должен играть ОБТК и его подразделения.

В функции ОБТК входят:

- контроль поступающих на предприятие сырья и материалов, энергетических ресурсов;
- контроль состояния оборудования и всех систем технического оснащения;
- контроль выполнения технологического процесса на всех стадиях изготовления продукции; контроль качества продукции; предупреждение, выявление и учет брака; установление причин брака;
- разработка мероприятий по устранению брака, рекламаций и улучшению качества продукции.

В конкретных условиях ОБТК может передавать часть своих функций специалистам производственных участков; это особенно характерно для производств МИ<sub>ивд</sub> для иммунохимических исследований, поскольку соответствующие технологии производства, как правило, связаны с необходимостью проведения большим объемом предварительных экспериментальных исследований.

Вся совокупность мероприятий технического контроля может быть разделена на входной контроль, контроль технологического процесса (операционный контроль) и приемочный контроль готового продукта.

Входной контроль – это контроль всех позиций сырья и материалов, используемых в производстве. В зависимости от характера сырья и материалов, их значимости в формировании качества конечной продукции и надежности их поставщиков входной контроль может ограничиваться только проверкой соответствия показателей качества сырья и материалов, указанных в сопроводительской документации, требованиям документов, определяющих нормативы этих показателей, но может выливаться и в лабораторный контроль сырья по всем показателям качества с использованием соответствующих методик исследования. В производстве МИ<sub>ивд</sub> для иммунохимических методов исследования во многих случаях качество сырья может быть оценено только прямой проверкой его пригодности для изготовления соответствующего продукта, т.е. изготовлением пробных серий продукта с использованием проверяемого сырья и испытаниями этих серий в сравнении с одной из ранее приготовленных серий того же продукта, успешно прошедшей весь необходимый контроль (референсной серией). Причем в указанных испытаниях, как правило, одновременно определяется и оптимальное количество сырья, используемого на соответствующих технологических стадиях и операциях. Результаты входного контроля документируются, как правило, актами входного контроля, на основании которых соответствующие позиции сырья и материалов допускаются производству либо бракуются с выставлением обоснованных рекламаций поставщикам.

Операционный контроль – это контроль соблюдения всех необходимых параметров технологического процесса, в том числе установленных показателей

качества всех вспомогательных и промежуточных продуктов. В производстве МИ для *in vitro* диагностики для иммунохимических методов исследования последнее нередко связано с необходимостью проведения контрольных операций, аналогичных упомянутым для входного контроля прямым проверкам возможности использования полученных вспомогательных и/или промежуточных продуктов в последующем технологическом процессе. Следует также отметить, что в этих производствах к операционному контролю относится также проверка качества всего комплекта реагентов, входящих в набор, т.е. фактически оценка основных показателей качества уже самого набора. Результаты операционного контроля фиксируются в соответствующих маршрутных картах.

И, наконец, приемочный контроль – это завершающая стадия технического контроля, когда предметом контроля является набор, как готовый продукт, готовый для отправки потребителю, т.е. набор реагентов, упакованных в групповую тару, маркированную в соответствии с требованиями ТУ на набор. В зависимости от характера МИ<sub>ивд</sub> и от конкретных условий производства приемочный контроль может ограничиваться только проверкой соответствия групповой упаковки и маркировки наборов требованиям ТУ на продукт, поскольку для гарантии выпуска качественного продукта достаточно уже положительных результатов операционного контроля, но может включать и контроль по всему перечню показателей качества, приведенных в ТУ на продукт. Результаты приемочного контроля фиксируются в паспорте на выпускаемую серию продукта, входящем в комплект сопроводительных документов, передаваемых потребителю вместе с продуктом.

Вся документация технического контроля на каждую выпущенную серию сводится в досье на нее.

Конкретные организационные формы технического контроля на различных предприятиях могут быть различными, но в любом случае рациональная его организация базируется на следующих принципах:

- технический контроль должен быть профилактическим, т.е. предупреждать выпуск некачественной продукции;
- технический контроль должен быть точным и объективным;

- затраты труда и средств на проведение технического контроля должны быть оптимальными;
- технический контроль должен быть максимально автоматизирован и иметь современное приборное оснащение;
- к выполнению функций технического контроля должны широко привлекаться работники производственных участков.

\*\*\*

### *Контрольные вопросы*

1. *Что такое техническая подготовка производства МИ<sub>ивд</sub>?*
2. *Какие документы входят в комплект технической документации для производства МИ<sub>ивд</sub>?*
3. *Основные требования к содержанию животных-продуцентов.*
4. *Что такое процедуры использования животных-продуцентов?*
5. *Что такое гипериммунизация животных-продуцентов?*
6. *Способы и правила отбора крови.*
7. *Основные правила подготовки крови для приготовления из нее диагностических препаратов.*
8. *Виды диагностических сывороток, основные правила их приготовления.*
9. *Основные стадии технологического процесса получения диагностических сывороток.*
10. *Правила подготовки лабораторной посуды.*
11. *Правила получения препаратов антигенов для иммунизации животных-продуцентов и бактериальных диагностикумов.*
12. *Состав наборов для реакции пассивной гемагглютинации и особенности их производства.*
13. *Состав наборов для реакции агглютинации латекса и особенности их производства.*
14. *Состав наборов для реакции микропреципитации кардиолипинового антигена и особенности их производства.*

15. Способы автоматизации регистрации и учета результатов РМП.
16. Состав наборов для иммунофлуоресцентного анализа и особенности их производства.
17. Типовой состав иммуноферментных тест-систем.
18. Особенности приготовления специфических компонентов ИФТС.
19. Неспецифические компоненты ИФТС и особенности их производства.
20. Состав наборов для иммунного блоттинга и особенности производства наборов для разных форматов ИБ.
21. Что такое технический контроль производства и требования к его организации?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунохимические методы исследования, т.е. методы, основанные на детекции комплекса *антиген-антитело*, появившись в начале прошлого века, к настоящему времени стали обязательной составной частью лабораторной диагностики состояний человеческого организма, в том числе его инфекционной и неинфекционной патологии. И сегодня для удовлетворения потребностей КЛД медицинская промышленность во всем мире выпускает обширнейшую номенклатуру иммунодиагностических тестов в виде наборов реагентов для реализации всех известных методов исследования.

Мировой рынок этой продукции считается одним из наиболее динамичных, причем его особенностью на сегодняшний день следует считать существенные сложности (до фактической невозможности) обеспечения Российского сегмента этого рынка продукцией наиболее развитых ее производителей – США, Великобритании и ЕС.

До конца прошлого века в связи с откровенно недальновидной политикой тогдашнего руководства страны отечественное производство МИ<sub>ивд</sub> (и в том числе иммунохимических тестов) было практически разрушено, а на отечественном рынке просто господствовала импортная продукция. Изменение политического вектора (в частности, официальный курс на широкое импортозамещение) позволило существенно исправить положение дел, и отечественные МИ<sub>ивд</sub>, стоимость которых при прочих равных характеристиках значительно ниже стоимости импортных аналогов, стали теснить на рынке импорт. А принципиальное изменение условий обращения этой продукции на мировом рынке в связи с событиями на Украине, поставило перед Российскими производителями МИ<sub>ивд</sub> задачу практически полного замещения импорта из стран, поддерживающих экономические санкции против России, соответствующими отечественными продуктами.

В число необходимых условий решения этой задачи входит и наличие необходимой учебно-методической литературы, посвященной разработке и производству иммунохимических средств лабораторной диагностики, и, как отмечено

в одной из глав настоящего пособия, оно является попыткой заполнения соответствующего учебно-методического вакуума. Авторы пособия надеются, что приведенное в нем краткое освещение как теоретических основ иммунохимической диагностики состояний человека, так и практических рекомендаций по разработке и применению соответствующих иммунохимических тестов и организации их производств позволит в какой-то мере заменить отсутствующие учебники и нормативно-методические документы, необходимые при подготовке специалистов для этой крайне актуальной отрасли медицинской промышленности.

Подводя итоги всем представленным в пособии аспектам теории иммунохимической диагностики и практических ее приложений, следует, очевидно, изложить и свое представление о перспективах их дальнейшего развития.

Что касается теории, то здесь хотелось бы, прежде всего, надеяться на пересмотр традиционных для медицины представлений о *норме* и *патологии*, как о принципиально несовместимых состояниях, вызываемых принципиально различными причинами и реализуемых принципиально различными механизмами. По нашему мнению, именно вера в наличие указанных принципиальных различий до сих пор не позволяет сформулировать такие определения базовых для медицины понятий как *болезнь* и *здоровье*, на основе которых можно было бы предложить конкретные критерии дифференциации или диагностики указанных состояний, пригодные для практического использования в любых конкретных ситуациях.

А если говорить о разделах медицины, непосредственно относящихся к иммунохимии и иммунохимической диагностике, то хотелось бы надеяться на то, что медицинская инфектология наконец-то окончательно избавится от представления об *инфекции* как о синониме *инфекционной болезни*, и, соответственно, в классификации микроорганизмов, обитающих в нашей внешней среде и непосредственно на нас, вместо их безусловного, но логически некорректного деления на *патогенные*, *условно патогенные* и *непатогенные виды*, будет принято деление, основанное на объективной характеристике взаимоотношений любого

микроорганизма с любым макроорганизмом – на вероятности развития патологического состояния (инфекционной болезни) при взаимодействии конкретного макроорганизма с конкретным микробным видом в конкретных условиях этого взаимодействия.

Такая корректировка господствующей ныне в медицине парадигмы, вероятнее всего, позволит, наконец, решить также задачу, непосредственно связанную с темой настоящего пособия, – задачу формулировки корректного и содержательного определения понятия «чужеродность» или «антигенность», позволяющего количественно оценивать соответствующее свойство интересующих нас объектов.

Учитывая, что решение таких, казалось бы, чисто теоретических проблем имеет прямое отношение к практике иммунохимической диагностики, есть основания считать, что оно все же будет достигнуто в обозримом будущем.

Что до прогноза перспектив развития методической базы иммунохимической диагностики, то поскольку в основе всех ее методов лежит детекция одного и того же явления – возникновения комплекса *антиген-антитело*, и, соответственно, основная цель развития этого направления – повышение чувствительности и специфичности методов детекции, то какими именно будут новые методы исследования или модификации существующих, зависит, очевидно, от новых методических разработок в смежных областях знания – биохимии и биофизике. Один вариант возможного развития методической базы иммунохимической диагностики можно указать уже сейчас – это сочетание традиционных методов исследования с новейшими приемами регистрации и учета результатов реакции *антиген-антитело*. Примером такого подхода может служить описанная в гл. 2.5. комбинация одного из наиболее старых методов исследования – РМП с кардиолипидным антигеном – и видеоцифровой регистрации результатов реакции *антиген-антитело*.

Что же касается разработки новых наборов реагентов и освоения их промышленного производства, то здесь можно отметить две очевидные и, на первый взгляд, противоположные тенденции развития.



С одной стороны, повышение эффективности работы клинических диагностических лабораторий достигается оснащением их все более совершенным оборудованием, позволяющим, в конце концов, автоматизировать весь процесс иммунохимического исследования – от постановки реакции до регистрации ее результатов и выдачи по ним заключения. Но у этой тенденции в настоящее время есть и отрицательная сторона – чем сложнее и совершеннее оборудование, тем в большей степени его использование возможно только с конкретными наборами реагентов конкретных же фирм (нередко выпускающих и соответствующее оборудование), что явно противоречит интересам рынка, поскольку ограничивает возможности потребителя в выборе необходимых ему продуктов.

Устранить возникающее при этом противоречие между интересами производителей и потребителей может унификация составов и технологии применения наборов реагентов, предназначенных для реализации одних и тех же методов исследования.

Нужно сказать, что необходимость такой унификации диктуется отнюдь не только названным противоречием. Она диктуется прежде всего наличием как на отечественном, так и на мировом рынке средств КЛД настолько большого числа различных иммунохимических тестов однотипных по своему назначению, что это рождает проблему их использования в практике КЛД.

Проблема заключается в том, что в большинстве случаев наборы, даже основанные на одном и том же принципе и тождественные по предназначению, но выпущенные разными фирмами, не совпадают друг с другом ни по перечням реагентов, ни по характеристикам реагентов, ни по протоколам постановок с их использованием. Это неизбежно приводит либо к дополнительным затратам времени персонала лаборатории на ознакомление с такими различиями и на учет их в работе, либо к отступлениям от буквы соответствующих протоколов постановки в угоду привычным алгоритмам работы, в особенности при проведении большого числа различных исследований. В еще большей степени осложняет работу персонала лабораторий использование наборов различного предназначения,

протоколы использования которых, даже если они выпущены одной фирмой, могут различаться уже принципиально.

Применительно к продукции одной фирмы целесообразность унификации состава реагентов и протоколов использования наборов вполне очевидна. Разумеется, в каждом наборе при этом все равно останутся реагенты, унификация которых невозможна, в принципе. Так, в ИФТС унификации не подлежат специфические реагенты наборов, т.е. реагенты, содержащие конкретные антигены и антитела к ним. Но неспецифические реагенты – все растворы для разведения и промывок, индикаторные растворы, стоп-реагент могут и должны быть унифицированы, чтобы их можно было использовать в постановках с различными наборами одного и того же типа. При этом очевидны выгоды такого решения не только для потребителя, но и для производителя, который получает возможность оптимизировать технологию производства за счет существенного сокращения номенклатуры промежуточных продуктов.

Строго говоря, потребность в унификации должна возникать на любом производстве диагностических тестов при расширении номенклатуры выпускаемой продукции, в особенности, когда эта номенклатура представлена многокомпонентными наборами реагентов для реализации одного и того же метода исследования. Но, если судить по приведенным в пособии примерам составов и технологических приемов получения однотипных по назначению реагентов для различных наименований МИ<sub>ивд</sub>, выпускаемых на предприятии «ЭКОлаб», необходимость решения указанной проблемы стала очевидной для специалистов предприятия лишь сравнительно недавно, и объем работы, предстоящей для ее окончательного решения, еще очень велик.

К сожалению, унификация каждой фирмой производимых ею тест-систем – это еще далеко не окончательное решение проблемы, поскольку при этом сохраняются различия между наборами разных производителей. И вовсе не факт, что для владельцев различных фирм идея унификации их продукции с продукцией конкурентов даже только в части ее неспецифических компонентов непре-

менно окажется достаточно привлекательной, особенно если по наборам, подлежащим унификации, имеется know-how – конфиденциальная информация, полученная в ходе производственной деятельности и представляющая преимущества в бизнесе за счет уникальности выпускаемой продукции.

Однако, стоит все же учитывать, что всякая монополия и всякая уникальность – это временные преимущества, которые могут быть в любой момент утрачены, превратив выгоды в откровенные потери сил и средств за счет итоговой бесполезности затрат на обеспечение утраченной монополии и уникальности.

И потому производитель уникального на сегодня лабораторного оборудования, ориентированного на использование наборов реагентов, производимых ограниченным кругом фирм, потеряв возможность использования выгод, предоставляемых ему сегодняшней уникальностью этого оборудования, в итоге все равно выигрывает за счет расширения возможностей его применения, т.е. за счет роста потребности в нем.

В выигрыше, в конечном счете, окажутся и производители наборов реагентов, поскольку уникальность тех или иных наборов, как правило, обеспечивается особенностями специфических реагентов или технологий их производства, т.е. унификация свойств и технологии производства неспецифических реагентов вряд ли отразится на уникальности набора.

Кроме того, идея унификации неспецифических компонентов однотипных наборов реагентов, может привести к организации специальных производств только таких реагентов, превратив их в закупные компоненты комплектации этих наборов и, соответственно, упростив технологические схемы их производства, т.е. удешевив эти производства.

Но унификация, проводимая по инициативе самих производителей, это лишь возможный и вовсе не обязательный вариант развития. Более надежным средством решения проблемы было бы принятие соответствующих нормативных документов, устанавливающих на государственном уровне обязательные требования к составу, характеристикам и правилам использования неспецифических реагентов в однотипных ИФТС независимо от их производителя. И хотелось бы

надеяться, что соответствующие государственные структуры все же увидят необходимость такого решения проблемы согласования интересов производителей и потребителей МИ<sub>ивд</sub>, тем более что лишь при успешном решении этой проблемы на уровне одного государства можно будет рассчитывать на соответствующие согласования уже межгосударственного уровня.

Другой тенденцией развития иммунохимической диагностики является тенденция разработки диагностических тестов, не требующих для своего использования никакого дополнительного оборудования и, соответственно, пригодных для использования как у постели больного, так и в полевых условиях. Т.е. речь идет об экспресс-тестах типа ИХА-тестов, описанных в главе 2.2.

Хотя обе эти тенденции выглядят как альтернативы – с одной стороны, совершенствование аппаратного обеспечения иммунохимических исследований, а, с другой, проведение исследования безо всякого дополнительного оборудования, на деле об их несовместимости не придется говорить, если ту же самую тест-полоску для ИХА рассматривать как полный комплект его аппаратного обеспечения. Так что обе тенденции логичнее рассматривать как необходимо дополняющие друг друга направления развития, целью которого является обеспечение практической медицины высокочувствительными и высокоспецифичными средствами своевременной диагностики состояний человеческого организма, доступными для использования как в любой клинической лаборатории, так и вообще в любых конкретных условиях. И авторы настоящего пособия надеются, что оно в какой-то мере будет способствовать такому развитию событий.

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Ig – иммуноглобулины.

IgA – иммуноглобулины класса А.

IgD – иммуноглобулины класса D.

IgE – иммуноглобулины класса E.

IgG – иммуноглобулины класса G.

IgM – иммуноглобулины класса M.

АГ – антиген.

АгКЛ – антиген кардиолипидный.

АПК – антигенпрезентирующие клетки.

АСО – антистрептолизин О.

АТ – антитело.

БОК – буферный раствор для разведения образцов.

БРРС – буферный раствор для разведения сыворотки.

БСА – бычий сывороточный альбумин.

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека.

ВПГ-1 – вирус простого герпеса 1 типа.

ВПГ-2 – вирус простого герпеса 2 типа.

ГА – гетерофильные антитела.

ЗФР – забуференный ФР.

ИБ – иммунный блоттинг.

ИК – иммунный комплекс.

ИП – инструкция по применению.

ИС – иммунная система.

ИФА – иммуноферментный анализ.

ИФЛА – иммунофлуоресцентный анализ.

ИФТС – иммуноферментная тест-система.

ИХА – иммунохроматографический анализ.

К<sup>-</sup> – контрольный отрицательный образец.

К<sup>+</sup> – контрольный положительный образец.

КББ – карбонатно-бикарбонатный буферный раствор.

КЛД – клиническая лабораторная диагностика.

КЭ – контрольные эритроциты.

МАК – мембраноатакующий комплекс.

МИ<sub>ивд</sub> – медицинское изделие для *in vitro* диагностики.

МКА – моноклональные антитела.

МСБ – манна-связывающий белок.

ОБТК – отдел биолого-технического контроля.

ОП – оптическая плотность.

ОПГА – обратная пассивная гемагглютинация.

ПЭГ – полиэтиленгликоль.

РА – реакция агглютинации.

РАЛ – реакция агглютинации латекса.

РИ – раствор индикаторный.

РИА – радиоиммунный анализ.

РИФ – реакция иммунофлуоресценции.

РМП – реакция микропреципитации.

РНГА – реакция непрямой агглютинации.

РОНГА – реакция обратной непрямой гемагглютинации.

РП – реакция преципитации.

РП – регламент производства.

РПГА – реакция пассивной гемагглютинации.

РРА – раствор для разведения антигена.

РРК – раствор для разведения конъюгата.

РРО – раствор для разведения образцов.

РРОК – раствор для разведения образцов и конъюгата.

РСК – реакция связывания комплемента.

РТГА – реакция торможения гемагглютинации.

РУ – регистрационное удостоверение.

СОП – стандартная операционная процедура.

ТМБ – тетраметилбензидин.

ТУ – технические условия.

ТЭ – тест-эритроциты.

УФЛ – ультрафиолетовые лучи.

ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат.

ФР – физиологический раствор хлористого натрия

ФР<sub>x25</sub> – 25-кратный концентрат ФР.

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор.

ЦБР – цитратный буферный раствор

ЦМВ – цитомегаловирус.

ЦПЭ – цитопатогенный эффект.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акиншина Ю.А., Марданлы С.С., Киселева В.А. Иммунохроматографический тест для дифференцированного выявления антител классов М и G к коронавирусу SARS-CoV-2. Клиническая лабораторная диагностика. 2020. № 65 (11), 688—692.
2. Антигены и антитела. Серологический метод лабораторной диагностики. <https://en.ppt-online.org/87706>
3. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие для студентов медицинских вузов / под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова М.: Медицинское информационное агентство, 2003. 236 с.
4. Биотехнология. Технология приготовления диагностических сывороток Казань, 2013. <https://infopedia.su/5x151e.html>
5. Биотехнология в вопросах и ответах: учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Фармация». Том 3 / В.В. Помазанов, С.Н. Суслина, В.А. Киселева, С.Г. Марданлы, Т.Е. Саматадзе, А.В. Швец, А.М.А. Эбзеева, Ю.К. Козлова, Д.М. Мутынова, А.В. Попова, А.А. Воронцова, Я.Р. Высокос, Е.Ю. Моисеева. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ, 2022. 210 с.
6. Бирюков В.В., Пискарева О.В., Боброва Т.П. Диагностическая значимость бактериологического и серологического методов при выявлении бактериальных кишечных инфекций. Государственное бюджетное учреждение Рязанской области «Консультативно-диагностический центр». [https://kdc.medgis.ru/uploads/userfiles/organization\\_715/publikacii/bakteriologicheskij\\_i\\_serologichesk.pdf](https://kdc.medgis.ru/uploads/userfiles/organization_715/publikacii/bakteriologicheskij_i_serologichesk.pdf)
7. Будущее практикующего врача – биотехнология: сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / В.В. Помазанов, С.Г. Марданлы, В.А. Киселева, Г.В. Егорова; под общей ред. С.Г. Марданлы, В.В. Помазанова, В.А. Киселёвой. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ, 2018. С. 160–170.

8. Васильев А.Г., Чурилов Л.П. Руководство по иммунологии и иммунопатологии. Введение. [https://vk.com/wall-136547353\\_51610](https://vk.com/wall-136547353_51610)
9. Гайдамович С.Я. Серологические исследования. Т.23 / Большая Медицинская Энциклопедия (БМЭ). В 30 т. / под редакцией Б.В. Петровского. 3-е издание. М.: Сов. энциклопедия, 1974-1989.
10. Галактионов В.Г. Иммунология. М.: Изд-во МГУ. 1998. 480 с.
11. Грязнева Т.Н., Родионова В.Б. Диагностические сыворотки и их применение в микробиологической практике: методические рекомендации. М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ, 2009. <https://studfile.net/preview/9434774/>
12. Грязнева Т.Н., Тихонов И.В., Девришов Д.А. Основы производства гипериммунных сывороток и иммунноглобулинов: учебно-методическое пособие по биотехнологии. М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2003. 48 с.
13. Данилов А.Н. Море информации в капле крови. Мультиплексная технология xMAP в клинической лабораторной диагностике: возможности и перспективы // Лечебное дело. 2011. № 4. С. 91-95
14. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. Одесса: АстроПринт, 1999. 603 с.
15. Иммунология. В 3 томах. Т.1: пер. с англ. / У. Пол, А. Сльверстайн, М. Купер и др.; под ред. У. Пола. М.: Мир, 1987–1988.
16. Иммунология / Е.С. Воронин, А.М. Петров, М.М. Серых, Д.А. Девришов; под ред. Е.С. Воронина. М.: Колос-Пресс, 2002. 408 с.
17. Иммунология для чайников. <https://a-v-efremov.narod.ru/immunity.html>
18. Иммунология и аллергология (цветной атлас): учебное пособие для студентов медицинских вузов / под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. М.: Практическая медицина, 2006. 288 с.
19. Иммунохимический анализ. [https://studopedia.su/10\\_97768\\_lektsiya--immunohimicheskiy-analiz.html](https://studopedia.su/10_97768_lektsiya--immunohimicheskiy-analiz.html)
20. Иммунохроматографический тест для выявления скрытой крови в кале / А.В. Никитина, Ю.А. Акиншина, Н.Е. Нищакова, Е.А. Амелина, С.Г. Марданлы // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. № 64 (9). С. 536-840.

21. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. М.: ООО «Медицинское информационное агентство, 2006, - 536 с.
22. Клиническая иммунология: учебное пособие для студентов 6-го курса медицинского факультета / В.Т. Германов, О.Н. Андрущенко, И.В. Руденко, А.В. Батарчуков. Луганск, 2000. 132 с.
23. Клиническая иммунология / В.А. Козлов, А.А. Савченко, И.В. Кудрявцев, И.Г. Козлов, Д.А. Кудлай, А.П. Продеус, А.Г. Борисов. Красноярск: Поликор, 2020. 386 с.
24. Клиническая лабораторная диагностика: учебник / под ред. В.В. Долгова. М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2016. 668 с.
25. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология: учебное пособие. М.: Высш. шк., 1985. 287 с.
26. Литвинова З.А., Землянская Н.А. Иммунология: учебно-методическое пособие для лабораторных занятий. Благовещенск: ДальГАУ, 2015. 47 с
27. Литусов Н.В. Методы исследования в медицинской бактериологии: электронное учебное пособие. Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2021. 232 с.
28. Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н., Емельянов В.В. Основы иммуноанализа: учебное пособие / под общ. ред. Н.Н. Мочульской; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Уральский федеральный университет. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2021. 148 с
29. Маракулин И.В. Современные методы идентификации микроорганизмов: учебное пособие. Киров: ФГБОУ «Вятский государственный университет». 2012
30. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики: автореферат дисс. на соиск. уч. степ. доктора медицинских наук. М., 2016. 48 с.
31. Марданлы С.Г., Киселева В.А., Мишуткина Я.В. Содержание и использование животных-продуцентов биологического сырья. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ, 2019. 88 с.

32. Марданлы С.Г., Киселева В.А., Ситникова Е.А. Медицинское и фармацевтическое товароведение: избранные лекции. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ, 2019. 173 с.

33. Марданлы С.Г., Куляш Г.Ю. Реакция пассивной гемагглютинации в серологической диагностике сифилиса: учебно-методическое пособие. 3-е издание. Электрогорск: ЗАО «ЭКОлаб», 2011. 40 с.

34. Марданлы С.Г., Мишуткина Я.В., Симонов В.В. Животные-продукты. деонтология содержания и использования. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ, 2018. 49 с.

35. Марданлы С.Г., Симонов В.В., Авдоница А.С. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2017. 208 с.

36. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Том 1: учебник / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко, 2010.

[http://vmede.org/sait/?page=13&id=Mikrobiologija\\_3verev\\_2010\\_t1&menu=Mikrobiologija\\_3verev\\_2010\\_t1](http://vmede.org/sait/?page=13&id=Mikrobiologija_3verev_2010_t1&menu=Mikrobiologija_3verev_2010_t1).

37. Медуницын Н.В. Вакцинология. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: Триада-Х, 2004. 448 с.

38. Методы микробиологической диагностики. Прикладная иммунология. Иммунодиагностика различных заболеваний. Серологические реакции. Система электронного и дистанционного обучения СВФУ. [https://yagu.svfu.ru/pluginfile.php/527089/mod\\_resource/content/1/серологический%20метод%20диагностики.pdf](https://yagu.svfu.ru/pluginfile.php/527089/mod_resource/content/1/серологический%20метод%20диагностики.pdf).

39. Микробиология: учебник / А.В. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.М. Рыбакова. 2-е изд" перераб. и доп. М.: Медицина, 2003. 336 с.

40. Мультиплексный дог-иммуноанализ в диагностике инфекционных заболеваний / А.Г. Полтавченко, А.В. Ерш, П.В. Филатов, Н.Д. Ушкаленко; отв. ред. А.Г. Полтавченко. Чебоксары: Среда, 2022. 224 с.

41. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых параземолитическими и другими патогенными для человека вибрионами: методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 26 с.
42. Перетрухина А. Т., Блинова Е. И. Бактерийные и вирусные препараты. Академия Естествознания, 2010. <https://monographies.ru/ru/book/view?id=137>
43. Попов Н.Н., Романова Е.А. Общая иммунология. Харьков: Издательский центр Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина. 2001. 220 с.
44. Преципитины. Реакция преципитации, ее разновидности: кольцепреципитация, преципитация в геле, реакция флокуляции, реакция микропреципитации. Применение в медицине. <https://studfile.net/preview/16858728/page:33/>
45. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 16 марта 2010 г. N 151н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным дерматовенерологического профиля и больным лепрой" (с изменениями и дополнениями) (утратил силу) Приложение N 9. Стандарт оснащения клинико-диагностической лаборатории 4. Стандарт оснащения иммунохимического (серологического) подразделения клинико-диагностической лаборатории. <https://base.garant.ru/12175104/6d08447b882defe838ab9ca9dc933e46/>
46. Простой герпес. Цитомегаловирусная инфекция: методические рекомендации № 9. М.: Департамент здравоохранения города Москвы. 2016. 34 с.
47. Разработка нового набора реагентов для скрининговой диагностики с целью одновременного обнаружения антител к каждому из основных возбудителей инфекций TORCH-группы методом линейного иммуноблоттинга / С.Г. Марданлы, В.А. Арсеньева, Ю.А. Акиншина, Е.А. Амелина, М.В. Захаров, А.В. Никитина. // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 6. С. 24-29.
48. Реакция агглютинации – определение, типы, механизм, применение. <https://microbiologynote.com/ru/agglutination-reaction/>
49. Реакции преципитации. <https://studfile.net/preview/9267061/page:16/>

50. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология: пер. с англ. М.: Мир, 2000. 592 с.
51. Романовская, Т.Р., Юркевич М.Ю. Инфекционная иммунология: лабораторный практикум. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. 51 с.
52. Серологическая диагностика манифестных форм острых кишечных инфекций: правила производства сывороток диагностических: учебное пособие / С.Г. Марданлы, Н.В. Юминова, Т.Ю. Гашенко, П.С. Колесников. М.: АО "Т8 Издательские Технологии", 2023. 30 с.
53. Стефани Д.В., Вельтищев Ю.К. Клиническая иммунология и иммунопатология детского возраста: руководство для врачей. М.: Медицина, 1996. 384 с.
54. Шушакова Е.К. Инфекция, вызванная вирусами простого герпеса, у семейных пар с нарушениями репродуктивной функции: обоснование подходов к ведению пациентов: дис. на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.  
[https://www.crie.ru/upload/iblock/ddd/nghukcs4k28133s9ig9xxny3gj9xxl86/disser1\(shushakova\).pdf](https://www.crie.ru/upload/iblock/ddd/nghukcs4k28133s9ig9xxny3gj9xxl86/disser1(shushakova).pdf)
55. Эшерихиозы у детей: проблемы диагностики и лечения / Н.В. Гончар, К.Д. Ермоленко, О.И. Климова, Мартенс Э.А., Лобзин Ю.В., Марданлы С.Г. // Медицина экстремальных ситуаций. 2020. Т. 22, № 2. С. 148–156.
56. Ярилин А.А. Основы иммунологии: учебник. М.: Медицина, 1999. 608 с.
57. Bailey & Scotts. Diagnostic Microbiology, 12th Edition.  
<https://pdftree.net/watch/44959>
58. Keenleyside W. Microbiology: Canadian Edition. Pressbooks Toronto, 2019.  
<https://ecampusontario.pressbooks.pub/microbio/>

*Учебное издание*

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ  
В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Учебное пособие

ГОУ ВО МО  
«Государственный гуманитарно-технологический университет»  
142611, Московская область, г. Орехово-Зуево, ул. Зелёная, д. 22.

Подписано в печать 15.02.2024.  
Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 39.06.  
Тираж 200 экз.

Отпечатано: АО «Т8 Издательские технологии»  
109316 Москва, Волгоградский проспект, д. 42, корпус 5.