

ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

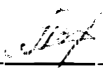
МАГИСТРАТУРА

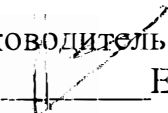
Кафедра «Прикладная биотехнология»

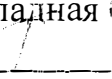
Магистерская диссертация

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ
ИММОБИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

6N0701 «Бистехнология»

Исполнитель  О.Д.Парийчук

Научный руководитель
Д-р вет.наук, профессор  Е.Б.Никитин

Допущена к защите:
Зав.кафедрой «Прикладная биотехнология»
Профессор  М.С.Омаров

Павлодар, 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
1 Литературный обзор	
1.1 Методы экспрессной диагностики инфекционных болезней	6
1.2 Реакция агглютинации латекса в диагностике инфекционных болезней	12
1.3 Сорбенты, применяемые для иммобилизации белковых препаратов	27
1.4 Методы сорбции белковых препаратов полимерными сорбентами	34
2 Патентный поиск	37
3 Экспериментальная часть	
3.1 Материалы и методы исследования	41
3.2 Сорбция яичного альбумина на полимерных сорбентах в различных средах	42
3.3 Изучение степени сорбции антигенов различной природы полимерным сорбентом	50
3.4 Интерпретация полученных результатов	54
4 Выводы	55
Заключение	56
Список использованных источников	57
Приложение А	
Приложение Б	

Нормативные ссылки

В настоящей магистерской диссертации используют ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 4.180-85 СПКП. Меры веса. Номенклатура показателей.

ГОСТ 1770-74Е Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки.

ГОСТ 4517-87 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе.

ГОСТ 4919.2-77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 27134-86 Аппараты и установки сушильные. Классификация.

Обозначения и сокращения

В настоящей магистерской диссертации применяют следующие обозначения:

x – значение отдельного признака;

$\bar{X}$ – средняя арифметическая величина;

n – общее число случаев;

Σ – среднее квадратическое отклонение от средней величины;

m – ошибка средней величины;

t – критерий Стьюдента.

В настоящей магистерской диссертации применяют следующие сокращения:

АГ – антиген;

АЕ – агглютинирующая единица;

Б – белок;

ИБК – инфекционный бурсит кур;

ИФА – иммуноферментный анализ;

ЛА – латексная агглютинация;

Н – носитель;

ОФД – ортофенилендиамин;

ПС – полистирольная суспензия;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РА – реакция агглютинации;

РАЛ – реакция агглютинации латекса;

РАМ – реакция агглютинации микродисперсии;

РИА – радиоиммунологический анализ;

РПГА – реакция пассивной гемагглютинации;

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации;

РПОЛМА – реакция пластинчатой окрашенной латекс-микроагглютинации;

РТГА – реакция торможения гемагглютинации;

РТАЛ – реакция торможения агглютинации латекса;

РФД – резоцинформальдегидная микродисперсия;

С – сшивающий агент;

ФЭК – фотоэлектроколориметр.

Введение

Актуальность проблемы. В диагностике инфекционных заболеваний, наряду с известными методами исследований, в последние годы всё более широкое применение находит реакция агглютинации латекса. Несмотря на то, что реакция агглютинации латекса известна уже более 50 лет, в иммунологии до последнего времени она ещё не нашла широкого применения. Тем не менее, усиливающаяся в последние годы тенденция использовать в качестве носителей антигенов и антител инертные синтетические материалы, привела к оживлению интереса к реакции агглютинации латекса и широкому изучению возможностей её применения в инфекционной и клинической иммунологии. Особый интерес вызывает простота постановки реакции, быстрота её выполнения, отсутствие необходимости в сложной аппаратуре.

Было установлено, что латексные частицы являются биологически инертными. Это, в сущности, искусственные полимеры исходных химических соединений, по которым они получили названия: полистирол, поливинилхлорид, поливинилтолуол и т.д. Такие частицы поддаются довольно точным химическим и физическим дефинициям, поэтому изготовление их можно стандартизировать на высоком уровне. При правильном хранении и соблюдении антисептики частицы латексов не изменяют своих свойств в течение длительного периода [5, 12, 16, 44, 45, 46]

Данная реакция по своему механизму аналогична реакции непрямой гемагглютинации, в которой используют сенсibilизированные антителами или антигенами эритроциты человека или животных. Вследствие больших и одинаковых для всех латексных частиц линейных размеров (порядка мкм) и возможности иммобилизации на них антител (антигенов), частицы латексов используют в качестве визуально обнаруживаемых маркеров поверхностных клеточных и растворимых антигенов или антител [16].

В связи с этим, поиск новых высокоэффективных полимерных сорбентов белковых и полисахаридных препаратов, позволяющих быстро и эффективно проводить обнаружение антигенов и (или) антител, является актуальной проблемой современной биотехнологии.

Цели и задачи исследований. Целью наших исследований явилось изучение возможности использования различных полимерных сорбентов для иммобилизации белковых и полисахаридных препаратов.

Для достижения намеченной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить свойства различных полимерных сорбентов, используемых для иммобилизации белковых препаратов;
2. Изучить условия, обеспечивающие наилучшую сорбцию белка альбумина полимерным сорбентом в различных средах;
3. Изучить возможности сорбирования на полимерных носителях антигенов полисахаридной природы
4. Дать заключение о возможности использования различных полимерных носителей для приготовления антигенных и антительных иммуносорбентов.

I Литературный обзор

1.1 Методы экспрессной диагностики инфекционных болезней

Количество методов, используемых для диагностики вирусных инфекций, непрерывно растет. Одни уходят в прошлое и имеют в основном историческое значение, другие совершенствуются. Несомненно, что технический прогресс в определении антител, белкового анализа и генодиагностики наряду с расширением наших знаний вируссов и патогенеза вирусных инфекций приведут к появлению новых высокоспецифичных и высокочувствительных методов, удобных для клинического применения.

В последние годы экспресс-диагностика вирусных инфекций существенно пополнилось большим количеством новых, высокоинформативных тестов, позволяющих проводить расшифровку этиологии заболевания с целью проведения своевременной этиотропной терапии. Заменяя в ряде случаев трудоемкие и требующие значительного времени методы вирусологических исследований, основанные на выделении и типировании вирусов на тканевых культурах, экспресс методы дали возможность существенно расширить диапазон этиологической диагностики.

К таким методам относятся латексные, иммуноферментные (ИФА) и радиоиммунологические (РИА) тесты для обнаружения у больного животного, как вирусных антигенов, так и противовирусных антител классов IgM и IgG, а также молекулярная гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР) для выявления фрагментов нуклеиновых кислот вирусов [6, 13, 25, 30].

Иммуноферментный метод – это метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса антиген-антитело за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями.

Для определения антигенов и антител применяются твердофазный (гетерогенный) вариант иммуноферментного анализа. Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции.

Иммуноферментный анализ по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител обладает следующими преимуществами:

1. высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата;
2. возможностью использовать минимальные объемы исследуемого материала; стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);

3. простотой проведения реакции;
4. наличием как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;
5. возможностью автоматизации всех этапов реакции;
6. относительно низкой стоимостью диагностических наборов.

Вышеперечисленные преимущества определили широкое применение ИФА во всех областях медицины, в том числе и при диагностике, профилактике и изучении вирусных гепатитов. Диагностические препараты для ИФА, предназначенные для выявления большинства серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и D выпускаются различными предприятиями и фирмами как у нас в стране, так и за рубежом.

В качестве твердой фазы в большинстве коммерческих диагностических препаратов используют полистироловые 96-ти луночные планшеты или полистироловые шарики [фирмы “ДИА-плюс”, “Рош” (“ROCHE”), “ЭББОТТ” (“ABBOTT”)]. Основные требования, предъявляемые к твердой фазе при проведении ИФА, включают: устойчивость к растворам, используемым в реакции;

Наличие высокой специфической емкости, т.е. способности сорбировать на своей поверхности антитела или антигены в количествах, необходимых для проведения реакции в сочетании с как можно меньшей неспецифической сорбцией белков из исследуемых образцов и конъюгатов.

Наиболее распространенным способом иммобилизации антител или антигенов является адсорбция, когда часть молекул за счет ионных и гидрофобных взаимодействий, а также образования водородных связей присоединяется к поверхности твердой фазы.

В настоящее время разработаны различные варианты твердофазного иммуноферментного анализа, и практически все они были апробированы или применены для выявления маркеров инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, D и E. Наиболее простой схемой проведения ИФА является “сэндвич”-метод. Общая схема проведения метода заключается в следующем. На твердой фазе адсорбированы антитела к исследуемому антигену. После инкубации исследуемого материала и образования комплекса антитело—антиген проводится удаление несвязавшихся компонентов, добавляется конъюгат, т.е. антитела к искомому антигену, меченные ферментом. По завершении инкубации с последующим удалением непрореагировавшего конъюгата промывкой образуется комплекс, в котором антиген как бы заключен между двумя слоями антител. Наличие меченных ферментом антител определяется при помощи соответствующего субстрата. “Сэндвич”-метод используется для выявления HBsAg, HBeAg, антигена вируса гепатита А. Для ускорения “сэндвич”-метода, применяется его модификация — “одностадийный сэндвич-метод”, при которой добавление исследуемого материала и конъюгата проводится одновременно. Так, для выявления HBsAg фирма “ДИАплюс” предлагает эту схему проведения реакции. При использовании диагностических наборов ИФА, основанных на этой схеме проведения реакции, необходимо помнить, что в исследуемом образце не должно быть веществ, ингибирующих активность

фермента, т. н. ферментных ядов, (например, азида натрия, применяемого в качестве консерванта). Одной из особенностей этого метода является снижение оптической плотности ферментативной реакции с образцами, имеющими крайне высокую концентрацию исследуемого антигена за счет образования комплекса HBsAg и конъюгата в растворе. Однако тщательный подбор концентрации меченых антител в конъюгате представляемого диагностического набора устраняет возможность получения ложнонегативных результатов с образцами, имеющими высокую концентрацию HBsAg.

Для выявления антител к различным антигенам вирусов гепатитов А, В, С и D применяются разнообразные варианты постановки ИФА, основными из которых являются:

1. Метод применяется для выявления анти-HBc IgM и анти-ВГА IgM. Общая схема проведения реакции заключается в следующем: на твердой фазе адсорбированы антитела к мю-цепям иммуноглобулинов класса М, которые взаимодействуют с антителами класса IgM, находящимися в исследуемой сыворотке. После удаления непрореагировавших компонентов добавляется стандартное количество антигена, антитела против которого Метод с использованием меченых вторичных антител (антител против иммуноглобулинов человека) и иммобилизованных антигенов на твердой фазе. Метод применяется для определения антител к вирусу гепатита С. Общая схема проведения реакции заключается в следующем: на твердой фазе иммобилизуют антиген, после инкубации исследуемого материала и удаления несвязавшихся компонентов добавляют меченые ферментом антитела к иммуноглобулинам человека класса IgG, которые взаимодействуют с Fc-фрагментом анти-ВГС. После проведения субстрат-ферментативной реакции проводят учет полученных результатов. При наличии антител уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных образцов. Для уменьшения возможных неспецифических реакций вводится специальный коэффициент, указанный в наставлениях, прилагаемых к диагностическим наборам.
2. Метод с использованием меченого антигена и иммобилизованного на твердой фазе антигена. Метод используется для выявления анти-HBs в диагностическом наборе "AUSAB" EIA фирмы "ЭББОТТ". Общая схема проведения реакции заключается в следующем: на полистироловом шарике адсорбирован HBsAg субтипа ad и ay, после инкубации с исследуемым материалом и удаления непрореагировавших компонентов добавляется HBsAg, меченный ферментом, который взаимодействует со свободными центрами связывания антител к HBsAg, провзаимодействовавшими с антигеном, сорбированным на твердой фазе. При наличии антител в исследуемой пробе уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных контрольных образцов.

3. Метод с использованием меченых и иммобилизованных антител, а также стандартного антигена. Этот вариант метода применяют для выявления анти-НВs и анти-НВе с диагностикумами фирмы (“ДИАплюс”). Общая схема проведения реакции заключается в следующем: на первом этапе реакции исследуемый образец смешивают с раствором, содержащим фиксированное количество антигена. После завершения инкубации добавляют шарик с сорбированными на нем антителами и конъюгат. После удаления непрореагировавших компонентов реакции проводится ферментативная реакция, интенсивность которой обратно пропорциональна содержанию исследуемых антител в образце. Вариантом этой схемы может служить определение анти-НВе и анти-дельта с диагностикумами фирмы “ЭББОТТ”, когда компоненты реакции добавляются последовательно.
4. Метод с использованием меченых антител и иммобилизованного антигена (конкурентный метод). Данная схема широко применяется для выявления анти-НВs, анти-НВс и анти-ВГА. Общая схема проведения реакции заключается в следующем: к антигену, иммобилизованному на твердой фазе одновременно добавляют исследуемый материал и конъюгат. При проведении реакции меченые и исследуемые антитела конкурируют за активные центры антигена, иммобилизованного на твердой фазе. После завершения инкубации и удаления не прореагировавших компонентов проводится ферментативная реакция, результаты которой обратно пропорциональны количеству антител в исследуемом образце. При использовании набора фирмы (“ДИАплюс”) при выявлении анти-НВs, в случае наличия НВsAg уровень ферментативной реакции будет превосходить результаты реакции в негативных образцах, что позволяет косвенно судить о наличии антигена.
5. Метод выявления антител класса IgM — многослойный “сэндвич” метод. Этот метод определяется. Удалив непрореагировавшие компоненты реакции, добавляют меченые антитела, реагирующие с антигеном. Также, как и в обычном “сэндвич”-методе, чем больше количество антител, тем интенсивней ферментативная реакция. Для уменьшения ложнопозитивных результатов исследование сывороток крови проводится после их разведения в 1000 раз.

Вышеперечисленные схемы проведения реакций по определению антигенов и антител не исчерпывают всего многообразия вариантов проведения иммуноферментной реакции. Разработаны варианты ИФА с использованием авидин-биотиновой системы, систем усиления ферментативной реакции, проведения реакции на фильтрах и т. д.

Для ферментативной метки антигенов или антител могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза и т. д. Во всех коммерческих тест-системах используется пероксидаза хрена, выбор которой определяется ее высокой удельной

каталитической активностью, доступностью, стабильностью, простотой детекции. В качестве субстратного реагента наиболее часто применяется орто-фенилендиамин (ОФД) с перекисью водорода, продукт окисления которого регистрируется фотометрически. Для остановки ферментативной реакции применяют “стоп реагент”, который добавляют во все исследуемые и контрольные пробы в равных количествах. Наиболее часто в качестве “стоп реагента” применяют серную кислоту. Учет результатов проводят спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

Одним из наиболее важных вопросов при проведении иммуноферментного теста является вопрос о специфичности результатов. Для подтверждения позитивных результатов при выявлении HBsAg применяется подтверждающий или подтверждающий тест. Четкое соблюдение всех параметров, указанных в наставлениях к диагностическим наборам для иммуноферментного анализа, позволяет избежать ложнопозитивных и ложнонегативных результатов, связанных с работой оператора.

Радиоиммунологический метод - это метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса антиген-антитело за счет введения в один из компонентов реакции радиоактивной метки с последующей ее детекцией. Основой проведения любого варианта РИА служит сравнительное определение единиц счета импульсов, зарегистрированных при исследовании в идентичных условиях стандартных и измеряемых образцов. При выявлении антигенов и антител для диагностики и изучения вирусных гепатитов применяется твердофазный вариант иммунохимического анализа, который может проводиться в различных вариантах постановки.

Радиоиммунологический анализ обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Так, например, с помощью коммерческого набора фирмы "ЭББОТТ" — Австрия II-I 125 удастся выявлять HBsAg в концентрациях до 0,1 нг/мл. К преимуществам метода можно отнести возможность стандартизации и автоматизации метода с получением ответов в цифровом выражении. Недостатком метода являются ограничения, определяемые режимом работы с радиоактивным материалом, и относительно короткий срок годности диагностического набора, что связано с распадом радиоактивной метки.

Диагностические наборы для выявления различных антигенов вирусных гепатитов А, В и D и антител к ним выпускаются фирмой "Изотоп" (Ташкент) и некоторыми зарубежными фирмами (например, фирмой "ЭББОТТ"). В качестве твердой фазы применяются полистироловые шарики ("ЭББОТТ") или пробирки ("Изотоп"). Для метки антител или антигенов чаще всего используется изотоп I^{125} , который имеет период полураспада 60 дней и высокую удельную радиоактивность. Измерение радиоактивной метки, т.е. излучения, проводится на специальных счетчиках — радиоспектрометрах. Подсчет радиоактивных импульсов как в контрольных, так и исследуемых образцах проводится в единое фиксированное время, обычно в течение 1 минуты. При анализе результатов реакции необходимо учитывать наличие фона радиоактивности, который может влиять на конечный результат реакции. Причиной повышенного фона могут быть: загрязнение контейнера или гнезда для пробы;

неправильная настройка прибора; наличие источника сильного излучения вблизи прибора.

Для подтверждения положительного результата, полученного при первичном скрининге образцов, рекомендуется повторное исследование РИА или в альтернативном тесте. При обнаружении HBsAg необходимо проводить подтверждающий тест.

Латексагглютинация - это метод выявления антигена и антител, основанный на агглютинации частиц латекса, сенсibilизированных антигенами или антителами. Латексные агглютинационные тесты – это группа наиболее быстрых и доступных методов в аналитической иммунохимии. Для изготовления диагностических препаратов, в большинстве случаев, применяют полистироловые латексы с диаметром частиц от 1 до 0,3 мкм. Методы, основанные на реакции агглютинации, довольно чувствительны и применяются для выявления антигенов на поверхности клеток или частиц и полуколичественного определения антител к этим антигенам. Суть метода заключается в следующем: при связывании клеток или частиц, покрытых антигеном, с антителами образуются крупные агрегаты. Для определения титра антител к поверхностным антигенам клеток или к антигенам, сорбированным на поверхности частиц, смешивают известное количество клеток или частиц, покрытых антигеном, с разными разведениями исследуемой пробы, например сыворотки.

По своей чувствительности реакция латексагглютинации значительно превышает иммунодиффузные тесты, реакцию преципитации в геле и встречный иммуноэлектрофорез, не уступает реакции пассивной гемагглютинации и может конкурировать с иммуноферментным и радиоиммунным анализами, прежде всего при использовании специальных анализаторов для учета степени агглютинации.

Преимуществом метода латексагглютинации является быстрота проведения реакции (5-10 минут), а также возможность длительного хранения диагностикума. Недостатком метода считают высокий процент ложнопозитивных результатов.

В конце 70-х и в начале 80-х годов несколькими фирмами (например, Pfizer, Behringwerke — коммерческое название препарата “Latex-HAA-reagent”) были разработаны и изготовлены диагностикумы для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В. Однако, наличие значительного количества ложноположительных результатов, совпавшее по времени, и массовое внедрение иммуноферментного анализа в службу переливания крови, привело к полному вытеснению этого метода из практики работы лабораторий, занимающихся определением HBsAg. В настоящее время вновь возник интерес к данному методу, что, прежде всего, связано с появлением латексов нового состава, при использовании которых регистрируется значительно меньше неспецифических реакций, а также с теоретической возможностью получения диагностикумов с высокой чувствительностью в сочетании с экспрессностью и простотой агглютинационных методов.

Таким образом, в инфекционной иммунологии применяются различные методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, но следует отметить, что все больший интерес вызывает реакция агглютинации латекса. Это объясняется возможностью применения различных синтетических материалов, в качестве носителей антигенов и антител, высокая чувствительность метода, а также быстрота и простота проведения реакции.

1.2 Реакция агглютинации латекса в диагностике инфекционных болезней

Латексагглютинация – метод выявления антигена и антител, основанный на агглютинации частиц латекса, сенсibilизированных антигенами или антителами. Агглютинация представляет собой склеивание носителей антигена с помощью иммунной сыворотки к этому антигену.

Реакция агглютинации бактерий с использованием соответствующей антибактериальной сыворотки относится к наиболее простым серологическим реакциям. Взвесь бактерий добавляют к различным разведениям испытуемой сыворотки крови и через определенное время контакта при температуре 37°C регистрируют, при каком наивысшем разведении сыворотки крови происходит агглютинация. Реакцию агглютинации бактерий используют для диагностики многих инфекционных болезней: бруцеллеза, туляремии, брюшного тифа и паратифов, бациллярной дизентерии, сыпного тифа.

Реакции агглютинации для определения группы крови и резус-фактора основаны на взаимодействии аллоантител и антигенов эритроцитов. Антитела против резус-фактора являются неполными, они не способны к прямой реакции с резус-положительными эритроцитами, поэтому для их обнаружения используют реакцию Кумбса, основанную на выявлении неполных антител с помощью антиглобулиновых сывороток. К эритроцитам известной специфичности добавляют исследуемую сыворотку крови, а вслед за этим антиглобулиновую сыворотку против IgG (непрямая реакция Кумбса). Fab-фрагменты неполных антител исследуемой сыворотки крови присоединяются к эритроцитам, а к свободным Fc-фрагментам этих антител присоединяются антитела против IgG, и происходит агглютинация эритроцитов.

Реакция пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА, РНГА). В ней используют эритроциты или нейтральные синтетические материалы (например, частицы латекса), на поверхности которых сорбированы антигены (бактериальные, вирусные, тканевые) или антитела. Их агглютинация происходит при добавлении соответствующих сывороток или антигенов. Эритроциты, сенсibilизированные антигенами, называют антигенным эритроцитарным диагностикумом и используют для выявления и титрования антител. Эритроциты, сенсibilизированные антителами, называют иммуноглобулиновыми эритроцитарными диагностикумами и применяют для выявления антигенов.

Реакцию пассивной гемагглютинации используют для диагностики заболеваний, вызванных бактериями (брюшной тиф и паратифы, дизентерия, бруцеллез, чума, холера и др.), простейшими (малярия) и вирусами (грипп,

аденовирусные инфекции, вирусный гепатит В, корь, клещевой энцефалит, крымская геморрагическая лихорадка и др.), а также для определения некоторых гормонов, выявления повышенной чувствительности больного к лекарственным препаратам и гормонам, например пенициллину и инсулину.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на феномене предотвращения (торможении) иммунной сывороткой гемагглютинации эритроцитов вирусами, используется для выявления и титрования противовирусных антител. Она служит основным методом серодиагностики гриппа, кори, краснухи, эпидемического паротита, клещевого энцефалита и других вирусных инфекций, возбудители которых обладают гемагглютинирующими свойствами, например, для серодиагностики клещевого энцефалита в лунки панели разливают двукратные разведения сыворотки больного на щелочном боратном буферном растворе. Затем добавляют определенное количество, обычно 8 АЕ (агглютинирующих единиц), антигена клещевого энцефалита и после 18 ч экспозиции при температуре 4°С вносят взвесь гусиных эритроцитов, приготовленную на кислом фосфатно-буферном растворе. Если в сыворотке крови больного есть антитела к вирусу клещевого энцефалита, то антиген нейтрализуется и агглютинация эритроцитов не происходит.

Багашева С. С. и др. проводили исследования по приготовлению штаммоспецифических эритроцитарных диагностикумов на основе препаратов IgG выделенных из гипериммунных моноклональных кроличьих сывороток.

Эритроцитарные диагностикумы, полученные на основе моноклональных антител к антигенным детерминантам Н3.7, Н3.10 и Н3.11 проявляют более высокую специфичность, чем иммуноглобулиновые препараты, приготовленные с использованием антител поликлональных сывороток. Такие иммунодиагностикумы могут быть использованы при изучении состава гемагглютининов вновь изолированных штаммов вируса гриппа [9].

Среди методов лабораторной диагностики вирусных инфекций в последние годы большое распространение получили так называемые непрямые реакции, основанные на феномене агглютинации. В качестве диагностикума в таких реакциях используют специфические антитела или антигены, фиксированные на поверхности неспецифических носителей органической или неорганической природы. Такими носителями чаще всего являются эритроциты, уголь, бентонитовые глины, содержащие белок А, стафилококки и синтетический латекс [1, 12, 13, 41].

В диагностике заболеваний, вызванных разными микроорганизмами, наряду с широко известными методами все большее применение находит реакция агглютинации латекса (РАЛ). Преимуществом РАЛ является её простота, быстрота выполнения и отсутствие необходимости в сложной аппаратуре [16].

Из литературы известно, что при создании агглютинирующих тестов в качестве носителей для сенсibilизации антигеном (IgG) обычно применяют эритроциты барана либо латексные микросферы. В каждом из перечисленных

выше способов требуется предварительное получение конъюгата IgG с макромолекулярным носителем, что существенно усложняет выполнение анализа.

Было установлено, что латексные частицы являются биологически инертными. Это в сущности искусственные полимеры исходных химических соединений, по которым они получили названия: полистерен, поливинилхлорид, поливинилтолуол и т.д. Такие частицы поддаются довольно точным химическим и физическим дефинициям, поэтому изготовление их можно стандартизировать на высоком уровне.

При правильном хранении и соблюдении антисептики частицы латексов не изменяют своих свойств в течение длительного периода [5, 12, 18, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 64].

Данная реакция по своему механизму аналогична РНГА, в которой используют сенсibilизированные антителами или антигенами эритроциты человека или животных, вследствие больших и одинаковых для всех латексных частиц линейных размеров (порядка мкм) и возможности иммобилизации на них антител (антигенов), частицы латексов используют в качестве визуально обнаруживаемых маркеров поверхностных клеточных и растворимых антигенов или антител.

Наиболее часто используют полистироловый латекс, несущий на поверхности карбоксильные группы. В составе носителя всегда имеется определённое число ионных детергентов, гидрофильные группы которых вместе с карбоксигруппами латекса создают общий поверхностный заряд, благодаря чему частицы латекса не самоагглютинируются. Полиакролеиновые латексы содержат на своей поверхности альдегидные группы, способные вступать в реакцию с первичными аминогруппами белков, образуя основание Шиффа [16].

Латексы можно сенсibilизировать как антигенами, так и антителами. Однако антигены полисахаридной и липопротеидной природы плохо связываются с функциональными группами латексов, поэтому в качестве лигандов чаще используют антитела [16].

Обнаружение антител в пробах сывороток методом РАЛ проводят в прямой реакции и в реакции торможения агглютинации латекса (РТАЛ). При всей своей методической простоте прямой вариант пока применяется недостаточно широко из-за трудности сенсibilизации частиц латексов вирусными антигенами. К настоящему времени получены антигенные латексные диагностикумы для выявления противокраснушных, противококлюшных, противогриппозных антител, однако технические детали приготовления этих препаратов не раскрыты [42].

Abbot A. et al. [43] разработали метод быстрого обнаружения в человеческих сыворотках антител к вирусу простого герпеса, основанный на агглютинации латексных частиц, покрытых очищенными антигенами. При параллельной проверке в РАЛ, ИФА и МФА 152 проб сывороток во всех трёх реакциях наблюдались совпадающие результаты, свидетельствовавшие об одинаковой эффективности и специфичности сравниваемых методов.

Исследователями было показано, что сыворотки кроликов, иммунизированных коревым антигеном, агглютинировали латексный диагностикум, полученный путём химического присоединения вирусного антигена к предварительно обработанным частицам латекса. Коревой латексный диагностикум агглютинировался гомологичными кроличьими сыворотками в разведениях 1:20-1:40. Однако данный иммуносорбент не был испытан в клинических условиях [4, 60, 61, 67].

Прямой вариант РАЛ для диагностики болезни Марека был разработан И. Л. Тыщенко и З.Д.Джаваловым [38]. Для сенсибилизации антигеном использовали карбоксилсодержащий полистироловый латекс с размером частиц 0,8 мкм. По данным авторов, чувствительность ИФА и РАЛ при этой инфекции одинакова, но РАЛ более экспрессна в получении результата.

Маренниковой С.С. с соавторами [29] удалось сенсибилизировать полистироловый латекс рекомбинантным антигеном вируса иммунодефицита человека, состоящим из поверхностных вирусных белков. При испытании диагностикума было получено полное совпадение результатов РАЛ, ИФА и иммунодотблотинга.

Антигенные латексные диагностикумы были получены и использованы также для диагностики бруцеллёза [31], легионеллёза [24], коклюша [5].

Более приемлемой для обнаружения антител в сыворотках крови, по мнению ряда авторов, является РТАЛ. В методическом отношении РТАЛ не отличается от других серологических реакций, основанных на феномене блокирования содержащимися в исследуемом материале искомыми антителами известного референс-антигена, добавленного в соответствующем количестве в тест-систему. Отсутствие агглютинации сенсибилизированных антителами частиц латекса свидетельствует о том, что антиген был связан на I этапе реакции гомологичными антителами, т.е. о положительном результате исследования. На моделях различных тогавирусов было показано, что РТАЛ, как и РЗНГА, при выявлении антител в сыворотках людей и животных значительно более чувствительна, чем РСК. Более того, РТАЛ позволяет обнаруживать антитела к тогавирусам в начальные периоды инфекций и в течение более длительного времени [27].

РТАЛ была успешно применена для ретроспективной диагностики энтенозирозной, внутриутробной, цитомегаловирусной, ротавирусной инфекций, гепатита В, гриппа и полиомиелита [13, 35, 65].

Следует отметить, что во многих случаях используемые отечественные типы латексов обладают способностью самоагглютинироваться в цельной сыворотке, что снижает диагностическую ценность данной реакции. Для устранения этого недостатка Ю.П.Резников и Ф.Р.Серна [33] рекомендуют предварительно диализовать латексы против дистиллированной воды в течение 10 суток, благодаря чему происходит освобождение латексных частиц от детергентов. После такого диализа, по данным авторов, не происходит самоагглютинации латекса, даже если к нему добавить цельную сыворотку крови.

Методика сенсibilизации латексов антителами для обнаружения вирусспецифических антигенов была детально разработана на модели вирусов растений и в дальнейшем не претерпела существенных изменений. Ещё ранее было показано, что адсорбция гамма-глобулинов на поверхности латексных частиц протекает в 2 этапа. На первом этапе происходит покрытие латекса одним слоем молекул гамма-глобулина, причём количество адсорбированного белка пропорционально площади поверхности частиц. На втором этапе формируется второй слой молекул гамма-глобулина, причём количество белка в этом слое примерно в 2 раза меньше, чем в первом. Высокая специфичность РАЛ обеспечивает получение отчётливых результатов, а также быстрое определение выделенного вируса или его антигена [36, 51, 52, 53, 54, 57, 59, 68, 69].

Рядом исследователей были оценены чувствительность и специфичность коммерческого теста РАЛ для обнаружения антигена вируса простого герпеса в элюатах с повреждений гениталий. Авторы установили, что чувствительность РАЛ составляет 73 %, а специфичность 93 %. Результаты проверки чувствительности РАЛ для обнаружения вируса простого герпеса в надосадочной культуральной жидкости инфицированных культур клеток показали достаточно высокую чувствительность метода при ярко выраженном ЦПД и более низкую эффективность при уровне ЦПД менее 25 % [62].

Э.К.Атаев и Е.П.Бабсренко [8] для обнаружения ящурных антигенов использовали отечественный полистироловый латекс с альдегидной группой с диаметром частиц 1 мкм. Конъюгирование антител с латексом, по данным авторов, происходит при разведении их 1:1000 в борно-щелочном буфере. При постановке реакции испытуемый материал и диагностикум смешивают на предметном стекле в соотношении 3:1, а учёт реакции проводят визуально после 3-5 минутного покачивания реакционной смеси.

РАЛ также применяется при диагностике инфекционного бурсита кур [23]. При этой инфекции реакция обладает специфичностью в 89%, причём чувствительность её в 15 раз выше чувствительности ВИЭФ и в 65 раз чувствительности РДП.

В последние годы РАЛ разработана и для диагностики чумы КРС и чумы плотоядных [11, 28]. Однако данная реакция при диагностике чумы КРС иногда проявляет неспецифичность в связи с добавлением в реагирующую смесь антисыворотки, а РАЛ при чуме плотоядных относительно длительна во времени - учёт результатов реакции проводят через 3-5 часов с момента её постановки.

В последние годы для приготовления препаратов, сенсibilизированных противовирусными антителами, стали применять частицы латексов, покрытые белком А стафилококков. Это позволяет использовать для сенсibilизации латекса любые иммунные сыворотки без какой-либо их предварительной обработки. Суть заключается в двухэтапном конъюгировании латексных препаратов - вначале с белком А, а затем, после удаления избытка белка, с иммунными сыворотками. Такие диагностические препараты в 4-16 раз активнее обычных антительных латексных диагностикумов [55, 56, 58, 66].

РАЛ широко применяется и в бактериологии - для диагностики колибактериоза [20], брюшного тифа [1], бруцеллёза [31], неisserиниоза [30] и других инфекций, а также для диагностики паразитарных болезней человека и животных [7].

Для сенсibilизации латексных частиц антителами или антигенами используются различные режимы, выбираемые в зависимости от природы лиганда и носителя. По данным Н.А.Дёминой и др. [34], для сенсibilизации латексов оптимальная концентрация иммуноглобулинов составляет 50-60 мг/мл. Учитывая различную сорбционную способность латексов, было предложено обрабатывать полистироловый полимер, смешанный с белковым лигандом, этанолацетатной смесью в течение 18 часов при температуре 5 град. С [63].

Несмотря на относительно высокую чувствительность, РАЛ при наличии в пробе малых количеств анализируемого препарата не всегда даёт положительные результаты. Для повышения чувствительности реакции антиген-антитело исследователями предложено добавлять к антигену или антителам (в реакционной смеси) полианионы типа декстрансульфата, гепарина и т.д. в оптимальных концентрациях от 0,001 до 0,5%. При этом чувствительность реакции возрастает на 4-8 двойных разведении испытуемого материала [26].

При постановке РАЛ обычно смешивают диагностикум и лиганд в полистироловых планшетах (по принципу РНГА) или на стеклянных пластинах (по принципу РА), при этом время агглютинации частиц латекса рассчитано как на быструю реакцию (в течение 2-15 минут), так и на длительное осаждение (3-18 часов после постановки), учёт реакции проводят как визуально, так и под световым микроскопом. Так, Н.Ф.Амфитеатрова и А.О.Кисилёв предложили после смешивания компонентов реакции на предметных стёклах реакционную смесь подсушивать, окрашивать фуксином и лишь, затем исследовать под микроскопом [5]. По данным авторов, такой способ учёта реакции позволяет выявлять противоклюшные антитела в более высоких титрах и более продолжительное время.

Кардаш Г.И. с соавт. [26] определили подходы к выбору условий учёта и контроля РАЛ с помощью метода светорассеяния. Этот метод имеет высокую чувствительность, которая зависит от длины волны падающего на реакционную смесь света.

И.П.Тыщенко предлагает для оптимизации параметров получения латексных диагностикумов и условий постановки РАЛ применять ультраструктурный анализ компонентов реакции путём электронной микроскопии [39]. При исследовании под электронным микроскопом реакционной смеси с положительной реакцией последняя представлена конгломератами, состоящими из латексных частиц, содержащих антигены или антитела и специфичных к ним антител (антигенов), обволакивающих каждую микросферу, образуя многочисленные агрегаты, видимые невооружённым взглядом.

Сравнительно недавно была разработана реакция агглютинации латекса (РАЛ) для прижизненной диагностики чумы плотоядных путём обнаружения вирусного антигена в выделениях из глаз и носа и фекалиях. В качестве носителя антител используют полиакролеиновые латексные частицы размером 1,6 мкм, окрашенные пиронином в розовый цвет. После сенсибилизации частиц латекса в течение суток при комнатной температуре в буферном растворе с рН 7,6-8,2 проводят их лиофильное высушивание в ампулах. Для исследования собирают у собак фекалии или выделения из носа и глаз, разводят деионизированной водой в соотношении соответственно 1:5 или 1:2 и центрифугируют при 3-4 тысячах об/мин. В конические пластмассовые пробирки с крышкой отбирают 0,2-0,3 мл надосадочной жидкости, добавляют 200-250 мг активированного угля, взбалтывают в течение 2-3 минут и оставляют при комнатной температуре на 15-20 минут, повторяя взбалтывание 2-3 раза. Образцы в конических пробирках центрифугируют при 3-4 тысячах об/мин в течение 5 минут, надосадочную жидкость используют в качестве антигена в РАЛ в разведениях от 1:2 до 1:2048. В качестве контроля используют несенсибилизированный иммуноглобулином латекс с растворителем - деионизированной водой. Реакцию ставят в микропланшетах для РГА при комнатной температуре и учитывают через 5-6 часов.

По данным авторов, при помощи РАЛ можно обнаружить антиген вируса чумы плотоядных у животных с различной степенью проявления клинических признаков заболевания. У здоровых животных и вакцинированных собак вирусный антиген этим методом не обнаруживается.

Авторы рекомендуют этот метод для обнаружения вируса чумы плотоядных на ранней стадии болезни и в качестве контрольного теста перед вакцинацией животных против чумы.

Разработана РАЛ для ретроспективной диагностики чумы плотоядных путём обнаружения вирусспецифических антител в сыворотках крови переболевших животных (Никитин Е.Б., 1998). Полистироловый латекс с размером частиц 0,5 мкм сенсибилизировали культуральным антигеном вируса чумы плотоядных, в течение 2 часов при комнатной температуре. Для постановки реакции на предметном стекле смешивали 20 мкл испытуемой сыворотки, 40 мкл коммерческого раствора гепарина и 5 мкл антигенного латексного диагностикума. Стеклянную пластинку покачивали в течение 8-10 минут при комнатной температуре. При положительной реакции становится заметна визуально или при просмотре под лупой агглютинация латексных частиц.

Антитела в сыворотках крови переболевших животных выявляются этим методом в титрах от 1:8 до 1:64 при эффективности 93%.

Также разработан и экспресс-метод прямой посмертной диагностики чумы плотоядных путём обнаружения антигена вируса в органах и тканях убитых с диагностической целью и павших животных в реакции агглютинации микродисперсии (РАМ) (Никитин Е.Б., 1998).

В качестве твёрдой фазы (сорбента антител) использовали резорцин-формальдегидную микродисперсию (РФД) с размером частиц 3 мкм, приготовленную в НИИ особо чистых биоматериалов (г. С.-Петербург), для

сенсibilизации частиц полимера использовали иммуноглобулиновую фракцию, выделенную из сывороток крови гипериммунизированных животных вирусом чумы плотоядных с активностью в РДП не ниже 1:4. Для сенсibilизации препараты антител разводили 0,15 М раствором КББ pH 9,2-9,4 до концентрации 40 мг/мл и смешивали с равным объемом 1% суспензии РФД на дистиллированной воде. Реакционную смесь инкубировали при $(4 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 16-18 часов при постоянном перемешивании. Полученный таким образом антительный диагностикум хранят при этой же температуре в течение до 6 месяцев.

Перед употреблением диагностикум однократно отмывают дистиллированной водой и ресуспендируют в этом же разбавителе до концентрации частиц полимера в 1%.

Для постановки РАМ на предметных стеклах с серией двойных разведений органов и тканей животных, начиная с 1:100, приготовленных на 0,15 М растворе КББ в объеме 40 мкл, добавляют равный объем антительного диагностикума, смесь покачивают при комнатной температуре в течение 5-6 минут. При положительной реакции визуально наблюдают агглютинацию частиц полимера.

Было установлено, что РАМ можно применять для диагностики чумы плотоядных вне зависимости от стадии заболевания, начиная от инкубационного периода и кончая агональным состоянием. При этом титры антигена в РАМ достигали 1:320 - 1:10400.

Исследованиями органотканевого материала, полученного от плотоядных животных, больных алеутской болезнью норок, инфекционным гепатитом и парвовирусным энтеритом, а также от здоровых вакцинированных и невакцинированных против чумы плотоядных животных, показана высокая специфичность РАМ, так как результаты при исследовании нормальных и гетерологичных антигенов были всегда отрицательными.

Целью исследования Абраменко Т. В. явились разработка метода получения реагентов для создания экспресс- метода анализа на основе реакции латексной агглютинации (ЛА) и проведение одновременного сравнительного определения в сыворотке крови больных экспресс- методом и способами, наиболее часто применяемыми на практике.

Полученный латексный конъюгат (ПС-IgG), использованный в разработанном экспресс- методе, обладал высокой устойчивостью и хранился в течение 1-1,5 лет, что говорит о том, что ковалентное связывание IgG с полимерными микросферами увеличивает срок годности диагностической тест- системы [3].

РАЛ отличается от постановки РНГА скоростью проведения анализа. Для постановки РАЛ требуется всего 3-3,5 ч, в то время как по способу Манчини результаты реакции читаются через 48 ч. К тому же чувствительность РАЛ в 100 000 раз превышает чувствительность реакции Манчини.

От ИФА РАЛ выгодно отличается одноэтапностью постановки и простотой выполнения. Для РАЛ не требуется дополнительного оборудования при чтении результатов реакции, к тому же возможно многократное

использование иммунологических планшет. По чувствительности РАЛ почти приближается к чувствительности ИФА [14].

Объектом исследования РАЛ может быть сыворотка крови, молозиво, моча, фекалии и др., т. е. все доступные объекты, содержащие антитела или антигены. РАЛ также можно использовать для тестирования микроорганизмов, взятых с культуральной среды [5].

В практике применения РАЛ известны латексы и готовые латексные диагностикумы [10, 21, 29, 37] таких фирм, как «Difco» (США), «Biometrieux» (Франция), «Wellcom Diagnostica» (Финляндия), а также латексы отечественного производства (ВНИИ синтетических каучуков, С.-Петербург, Институт биоорганической химии им. И. М. Шемякина, Москва). Следует отметить продукцию производства «ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ» (С.-Петербург). Сегодня в каталоге продукции фирмы 56 наименований высоконадежных, удобных в использовании диагностических наборов. Наборы имеет программы адаптации к 22 анализаторам зарубежного производства, которые составляют около 80% парка биохимических анализаторов России. Более полного спектра биохимических наборов собственного производства не имеет ни одна отечественная компания.

Однако, используемые в практике здравоохранения такие тест-системы, как Пастер VDRL латекс (Франция) и трепонемный полистироловый монодисперсный латекс (Россия, СПбНИИВС), имеют определенные недостатки. Так, в первом препарате имеются нетрепонемный кардиолипиновый антиген, что снижает специфичность этой реакции. При приготовлении второго требуется предварительная активация метакриловой кислотой, что увеличивает время приготовления препарата и снижает экологичность технологии. Кроме того, эти тест-системы недостаточно демонстративны из-за отсутствия окрашивания латекса.

Сотрудники кафедры кожных и венерических болезней Ставропольской государственной медицинской академии провели исследования по совершенствованию реакции агглютинации латекса (РАЛ), направленные на повышение эффективности диагностики сифилиса. В работе использовались полиакролеиновый латекс, окрашенный пиронином-Г, и обработанный ультразвуком трепонемный антиген. Приготовление диагностикума осуществлялось следующим образом: в 2-5% водный раствор полиакролеинового латекса с диаметром частиц 0,6-1,8 мкм добавляли 0,01 мас.% красителя пиронин-Г. Полученную смесь перемешивали 2-3 ч при комнатной температуре с помощью магнитной мешалки, а затем дважды промывали дистиллированной водой центрифугированием, диспергировали до исходной концентрации, хранили при температуре 4-6⁰С. К 2 мл 2% суспензии с диаметром частиц 0,6-1,8 мкм добавляли 0,15-0,25 мг обработанного ультразвуком антигена в 2 мл 0,1 М фосфатно-солевого буфера рН 7,2 и 2 мл физиологического раствора поваренной соли. Сенсибилизацию проводили 3 ч при комнатной температуре на магнитной мешалке, осаждали и дважды промывали в фосфатно-солевом буфере. Полученный препарат диспергировали

до исходного объема и разливали в пенициллиновые флаконы по 3 мл. Диагностикум лиофилизировали или использовали в нативном виде.

В результате проведенной работы были подобраны оптимальные условия конструирования латексного трепонемного диагностикума. Установлено, что наибольшие преимущества имеет использование полиакролеиновых носителей с диаметром частиц 1,2 мкм в количестве 100 мг и сенсibiliзирующей дозы антигена 0,20 мг.

Предварительные исследования экспериментальных серий с сыворотками больных различными формами сифилиса и здоровых лиц позволяли установить 95% чувствительность препарата и 99,8% специфичность. При сравнении теста экспресс - диагностики сифилиса с кардиолипином и предлагаемой РАЛ с обработанным ультразвуком антигеном выявлено совпадение результатов в 97%. РАЛ превышала метод экспресс-диагностики сифилиса по степени позитивности теста (на 3%), специфичности (на 0,8%) и чувствительности (на 0,7%), особенно при ранних формах сифилиса (на 1,1 и 0,9% соответственно) [10].

Наиболее часто для получения латексных диагностикумов в производстве используют полистироловый латекс, несущий на своей поверхности карбоксильные группы.

Латексные частицы с успехом можно сенсibiliзировать как антителами, так и антигенами, способными связываться с функциональными группами носителя [16, 29].

Основными требованиями, предъявляемыми к латексным дисперсиям, при разработке диагностикума являются: монодисперсность взвеси, агрегативная устойчивость в электролитах, минимальный разброс латексных частиц по размерам, а также высокая сорбционная активность их поверхности [39].

В ряде исследований были сделаны попытки существенно повысить чувствительность метода агглютинации частиц-носителей путём разработки новых способов контроля, имеющих высокую чувствительность, и обеспечить количественный контроль за ходом процесса агглютинации. Но все они имеют ряд недостатков (либо сложность аппаратного исполнения, либо продолжительность анализа). Был предложен способ контроля за реакцией латексной агглютинации, основанный на наблюдениях за изменением отношения интенсивностей рассеянного света для выбранной пары углов рассеяния, который даёт хорошие результаты, но не обладает экспрессностью [26, 65].

Remington с соавторами получили латексный диагностикум с сорбированными антигенами *Toxoplasma gondii* для выявления специфических антител в сыворотке крови. Другие сенсibiliзировали полистироловый латекс антигенами из *Reckettisia richettsii*, очищенных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Однако антигены полисахаридной и липополисахаридной природы плохо связываются с функциональными группами латексов, поэтому чаще в качестве лигатов используют антитела. Так, как иммуноглобулиновые диагностикумы успешно применяют при выявлении антигенов вируса

краснухи, ротавирусов, полисахаридов *Neisseria meningitidis* группы В, антигенов *Clostridium difficile* в фекалиях, циркулирующих иммунных комплексов и ревматоидного фактора, иммуноглобулинов в молозиве кобыл использовали РАЛ для определения альбумина в моче при диабетической нефропатии, другие разработали быстрый способ определения скрытой крови в фекалиях.

Для сенсибилизации латексных частиц антителами или антигенами используются различные режимы в зависимости от природы выбранного лиганда и носителя. Так, Р. Severin предлагает для получения антительного диагностикума инкубировать полистироловый латекс с оптимальным разведением иммуноглобулина 2 ч при 37⁰С в глицин-забуферном физиологическом растворе (рН 8,2) с последующей блокадой несвязавшихся активных групп бычьим сывороточным альбумином. Ю. В. Лукин и соавт. получали иммунолатексные конъюгаты путем инкубации суспензии полиакроленового латекса с иммуноглобулинами в течение 2 ч при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4).

Для сорбции антигенов на латексных частицах режим сенсибилизации зависит в большей степени от структуры антигена и его концентрации. Существует способ, заключающийся в обработке полистиролового латекса, смешанного с белковым лигандом, этанол-ацетатной смесью, в течение 18 ч при 5⁰С. После центрифугирования при 16000 g этанол-ацетатный супернатант отбрасывали, а осадок латекса ресуспендировали в глицин-солевом буфере. Таким образом, количество антигена, адсорбированного силовым методом, ограничено только пределом насыщения поверхности частиц. В таких условиях активные группы латекса максимально связаны с белковыми лигандами.

При постановке РАЛ обычно исследуемый объект в оптимальном разведении непосредственно смешивают с суспензией латексного диагностикума в ячейках полистироловых планшетов или на стеклянных пластинах [8]. Смесь встряхивают и оставляют для осаждения. Предлагается модификация метода: исследуемую сыворотку инкубируют в ячейках полистироловых планшетов 1 ч при 37⁰С с последующим её удалением. Без высушивания в ячейки добавляют суспензию латексного диагностикума, платы встряхивают и инкубируют 1 ч при 37⁰С. После центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин платы оставляют для осаждения частиц на 1-1,5 ч при комнатной температуре.

Как указано выше, большим преимуществом РЛА является быстрота ответа при простоте постановки. Это обстоятельство привлекло к нему внимание как к одному из возможных путей разработки быстрых методов диагностики СПИД и ВИЧ-инфекции.

К моменту начала исследований Маренникова С. С. и др. в доступной им литературе имелась лишь одна публикация по использованию РЛА для выявления антител в ВИЧ. Авторам удалось сенсибилизировать полистироловый латекс рекомбинантным антигеном ВИЧ, состоявшим из поверхностных белков. При испытании диагностикума на 95 сыворотках, содержащих антитела к ВИЧ, и 116 отрицательных сыворотках получено

полное совпадение результатов при ИФА и иммуноблоте, что позволило высоко оценить диагностические возможности этого теста. Последующее широкое использование теста в Африке дало неоднозначные результаты: РЛА оказался надежным только в опытных руках [29].

Плотниковой Э. М. и др. были проведены исследования по разработке технологии изготовления бруцеллезного латекс - диагностикума для индикации бруцеллезного антигена.

Полученный диагностикум испытывали в реакции латексагглютинации (РЛА) согласно общепринятой методике, оценку активности препарата проводили по 4 балльной системе. В качестве положительного антигена использовали стандартный бруцеллезный и полученный гамма облучением бруцеллезный антиген, а в качестве отрицательных контролей - сальмонеллезный и туляремийный антигены.

Чувствительность, активность и специфичность полученного диагностикума испытывали в РЛА с использованием различных штаммов бруцелл и гетерологичных культур (сальмонеллы, туляремийные антигены). Результаты испытаний показали, что полученный по новой технологии тест является активным, специфичным и по скорости получения ответа значительно превосходит существующие тесты [32].

Амфитеатрова Н. Ф. и др. провели исследования по разработке более чувствительного, быстрого во времени исполнения и менее сложного в оценке результатов метода обнаружения противокклюшных антител в слюне на основе РАЛ.

Для этого полистироловый монодисперсный латекс с диаметром частиц 0,55 мкм, приготовленный во ВНИИ синтетических каучуков (С.- Петербург), сенсibilизировали дезинтегратором *V. pertussis*.

Для оценки специфичности диагностикума одновременно проводили РПОЛМА (реакция пластинчатой окрашенной латекс-микроагглютинации) в гомологичной и 16 вариантах гетерологичных тест-систем. РПОЛМА была положительной только в гомологичной тест-системе [5].

Джавадова И. М. и др. разработали латексный антителный диагностикум для выявления антигена вируса инфекционного бурсита кур (ИБК), который прост в получении, имеет высокую чувствительность и специфичность и может быть использован для экспресс диагностики инфекционного бурсита кур.

В опытах использовали 35-40 суточных цыплят яичных пород. Птицу заражали патогенным штаммом 52/70 вируса ИБК и через разные сроки исследовали фабрициевы сумки. Патологический материал гомогенизировали в 0,01 М фосфатносолевом буфере рН 7,2 в соотношении 1:1 (вес/объем), трижды замораживали и оттаивали. Вируссодержащую суспензию 30 мин. центрифугировали при 3000g, надосадочную жидкость применяли в качестве антигена.

Гипериммунную сыворотку к вирусу ИБК получали иммунизацией цыплят инактивированной масляно-эмульсионной вакциной. Из сыворотки выделяли гамма-глобулиновую фракцию осаждением сульфатом аммония.

Латексный антительный диагностикум готовили, смешивая суспензию латекса (2%-ная концентрация частиц) с равным объёмом гамма-глобулиновой фракции в соответствующем буферном растворе.

Чувствительность РАЛ с латексным антительным диагностикумом к антигену вируса ИБК была сравнима с результатами РДП и ВИЭФ при исследовании положительных антигенов и при заражении цыплят патогенным штаммом 52/70 вируса ИБК [23].

Результаты исследований сотрудников Института физиологически активных веществ (г. Череповец) могут иметь большое значение в клинической практике при распознавании того или иного вирусного заболевания. Разработанный ими метод определения вируса чумы плотоядных с использованием латексного диагностикума обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может быть предложен для ветеринарной практики в качестве диагностического теста при анализе ВЧП у собак.

Для получения латексного диагностикума использовали полистирольную суспензию (ПС), представляющую собой сополимер стирола с метакриловой кислотой, содержащую на поверхности микросфер реакционноспособные карбоксильные группы для ковалентного связывания с белком.

В качестве иммуноспецифического реагента для приготовления латексных конъюгатов применяли γ -глобулиновую фракцию, выделенную из иммунной сыворотки кролика, в которой присутствовали антитела, обладающие специфичностью к ВЧП [2].

Воробьёвой З. Г. и др. разработан достаточно стабильный, чувствительный и специфичный латексный антигенный туберкулезный диагностикум, испытанный в хозяйствах Рязанской, Орловской, Тульской, Тверской областях. Для получения латексного диагностикума они использовали полиакролеиновый латекс с размером частиц 1,8 мкм, окрашенный пиронином в розовый цвет. Латекс сенсibilизировали при pH 8,6 водорастворимой фракцией белков сониката бактериальной массы М. Bovis штамм Valee (полученного дезинтеграцией на УЗДН-2Т при частоте 22 кГц с водяным охлаждением), убитого фенолом.

Диагностикум апробировали с гипериммунными к 5 разным видам микобактерий кроличьими сыворотками. В этих опытах установили высокую видовую специфичность и чувствительность его [17].

В Украинском НИИ экспериментальной ветеринарии отработана реакция агглютинации в латексе для обнаружения адгезивного антигена K99 у эшерихий в фекалиях и содержимом кишечника телят на основе отечественных полистироловых монодисперсных латексов с различным диаметром частиц и определение возможности её применения в производственных условиях.

Для приготовления латексных диагностикумов использовали кроличьи антиадгезивные K99 сыворотки с титром агглютининов 1:800-1:1600 в РА. Гамма-глобулиновую фракцию получали высаливанием 38%-ным сульфатом аммония или осаждением 60%-ным раствором полиэтиленгликоля и хранили до использования при минус 20⁰С. Контролем служила гамма-глобулиновая

фракция нормальной кроличьей сыворотки. Носителями специфических иммуноглобулинов были полистироловые латексы с диаметром частиц 0,82 и 0,97 мкм.

Для экстракции адгезивного антигена K99 из фекалий новорожденных телят пробы смешивали с глицин-забуферным физиологическим раствором, содержащим 0,5% глицерина (1:3), нагревали 20 минут на водяной бане при 60°C и центрифугировали 30 минут при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для реакции латекс-агглютинации.

Диагностикум на основе латексных частиц диаметром 0,31 мкм, иммобилизированных иммуноглобулинами в разведении 1:40, обладал высокой чувствительностью и выявлял белок фимбрий в концентрации 12,5 мкг/мл.

Степень разведения латексов глициновым буфером влияет на чувствительность реакции. Оптимальное соотношение латексов и буфера 1:3, такой диагностикум позволил обнаружить белок фимбрий K99 в концентрации 6,25 мкг/мл.

Иммобилизация латекса гамма-глобулиновой фракцией в разведении 1:80 не снижала чувствительности препаратов, что, очевидно, связано с уменьшением концентрации частиц латексов и количества иммуноглобулинов.

Изучение стабильности отрицательных контролей и специфичности реакции показало, что наиболее четкие результаты были получены при использовании диагностикумов, приготовленных на основе глицинового буфера с 0,5% глицерина. Внесение в качестве стабилизатора 0,1% бычьего сывороточного альбумина сопровождалось спонтанной агглютинацией частиц, иногда оцениваемой на ++ [19].

В научно-производственном объединении «Диагностические системы» (Нижний Новгород) для получения специфических латексных диагностикумов для количественного определения иммуноглобулинов классов G, A и M использовали в качестве носителя латекс АКРОЛАР-к (ТУ-6-09-10-1824-88), окрашенный пиронином в розовый цвет, с размером частиц 1,8 мкм (производство Института бисоорганической химии, Москва).

Результаты реакции оценивали по 4-крестовой системе через 3 ч после её постановки. Выявлено соответствие получаемых результатов определения количества иммуноглобулинов способом Манчини в РАЛ [15].

Изучение возможности определения с помощью РАЛ иммуноглобулина класса M (IgM) также стало целью сотрудников Научно исследовательского ветеринарного института Нечерноземной зоны РФ. Они предлагают использовать для количественного определения IgM специфический латексный диагностикум. Целесообразность его использования основана на определенных преимуществах РАЛ по сравнению со способом Манчини, а также с чувствительным иммуноферментным анализом (ИФА).

При получении специфического латексного диагностикума для выявления IgM в качестве носителя был использован латекс АКРОЛАР-к, окрашенный пиронином в розовый цвет с размером частиц 1,8 мкм. На поверхности специфических частиц латекса находятся активные альдегидные группы, способные вступать в химическую связь с аминогруппами белков,

образуя основание Шиффа. Частицы латекса между собой не агглютинируются, так как в составе носителей имеются ионные и неионные детергенты.

Специфичность диагностикума определяли в реакции торможения. Для нейтрализации IgM в исследуемой сыворотке использовали атииммуноглобулиновые моноспецифические сыворотки против IgM и IgG из набора для реакции Манчини (производство НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РФ, Нижний Новгород).

Сравнительной оценке РАЛ и ИФА был посвящен ряд исследований. Результаты в достаточной степени разноречивы, что определяется, с одной стороны, характеристикой конкретных диагностических наборов, с другой- условиями и сроками взятия и хранения исследуемого материала.

В работе Горбачева Е. Г. и др. представлены результаты сравнительной оценки эффективности использования в диагностике ротавирусных гастроэнтеритов отечественной ИФА-тест-системы и коммерческих латексовых диагностикумов. Использовали антигены ротавирусов различного происхождения- человека, телят и свиней.

Для исследования использовали коммерческие диагностикумы – «Rotalex» (Финляндия) и «Slidex Rota Kit» (Франция). Постановку реакции осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями.

В ряде случаев авторы указывают на наличие ложноположительных результатов РАЛ, обусловленных неспецифической агглютинацией латекса. Частота их варьирует от 5 до 20%. Возможными причинами неспецифической агглютинации могут быть присутствующие в отдельных образцах фекалий антиглобулиновые (ревматоидный фактор и др.) факторы [15, 40].

Необходимо отметить, что, несмотря на простоту реакции, в каждом конкретном случае необходимо тщательно отрабатывать условия приготовления иммуносорбента и постановки реакции: буферную среду и её рН, концентрацию сорбируемого вещества, время инкубации, соотношение реагирующих компонентов и т.д.

Как уже отмечалось выше, РАЛ по чувствительности и специфичности превосходит многие классические серологические реакции и иногда уступает лишь диагностическим методам "третьего поколения" (ИФА, РИА). В то же время РАЛ значительно проще в постановке, не требует какой-либо специальной аппаратуры и может быть рекомендована для использования в практических лабораториях в качестве экспрессного метода выявления вирусных антигенов и протизовирусных антител. К недостаткам данного теста можно отнести то, что не всякая партия латекса годится для создания диагностикума, что совершенно не умаляет ценность реакции.

Таким образом, латексы - это перспективные носители для получения специфических диагностикумов, используемых для анализа различных объектов при широком круге заболеваний бактериального и небактериального происхождения. Усовершенствование сорбционной способности латексов расширяет возможность получения диагностикумов с различной природой

лигандов. Стандартность и стабильность таких препаратов способствует широкому применению их в серологии [16, 20, 22, 23, 31, 32, 40].

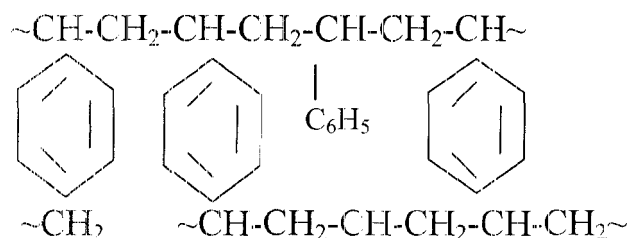
1.3 Сорбенты, применяемые для иммобилизации белковых препаратов

Для получения иммобилизованных белковых препаратов используется огромное число носителей. Основные требования, предъявляемые к материалам, которые могут быть применены для иммобилизации белков, следующие:

1. высокая химическая и биологическая стойкость;
2. высокая механическая прочность;
3. достаточная проницаемость для белка и субстрата, большая удельная поверхность, высокая вместимость, пористость;
4. возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм;
5. легкое переводение в реакционноспособную форму;
6. высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность проведения связывания белка с носителем в водной среде;
7. невысокая стоимость.

Огромное разнообразие доступных синтетических полимеров обеспечило их широкое использование в качестве носителей для иммобилизации белков. Вводя в полимерные молекулы различные функциональные группы, можно в широких пределах варьировать физические свойства носителя и создаваемое им микроокружение для иммобилизованных молекул белка. Синтетические полимеры применяются как для ковалентной иммобилизации белков, так и для сорбционной.

Полимеры на основе стирола. Они являются основой многих промышленных марок ионообменных материалов. Для сорбционной иммобилизации применяются как микропористые, так и макропористые материалы. Сополимеры стирола в виде сферических частиц с различными сшивающими агентами можно получить гранульной полимеризацией. Наиболее часто в качестве сшивающего агента используется дивинилбензол. Структурный фрагмент с дивинилбензолом можно представить так:



Геометрическая структура таких макропористых носителей варьируется в широких пределах при изменении количества сшивающего агента и концентрации растворителя мономеров в реакционной среде. Пористость сополимеров стирола регулируют также тем, что проводят полимеризацию в

присутствии порообразователей, например, добавок, разлагающихся при нагревании с выделением газообразных веществ.

Носители на основе сополимеров стирола и дивинилбензола выпускаются в промышленном масштабе.

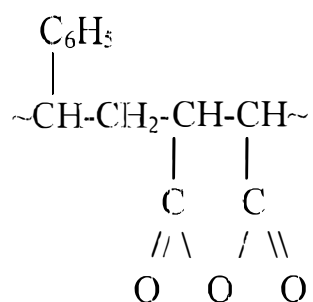
В последнее время стали применяться также носители, имеющие макросетчатую, изопористую и гетеропористую структуры. Макросетчатые полистиролы подобны стеклам, они имеют стабильную структуру пор, не набухают в воде, отличаются повышенной механической прочностью. Получают их эмульсионной сополимеризацией стирола с дивинилбензолом в присутствии осадителя.

Изопористый макросетчатый полистирол не обладает пористостью в сухом виде, образуется он при сшивании стирола в дихлорэтано, содержащем п-ксилилендихлорид.

Под действием монохлорметилового эфира и порообразователя можно получить гетеропористый полистирол с диаметром пор около 1 мкм. Применение гетеропористых носителей обеспечивает для различных по размерам белков сохранение высокой остаточной активности, по-видимому, за счет структурного соответствия молекулы белка и матрицы.

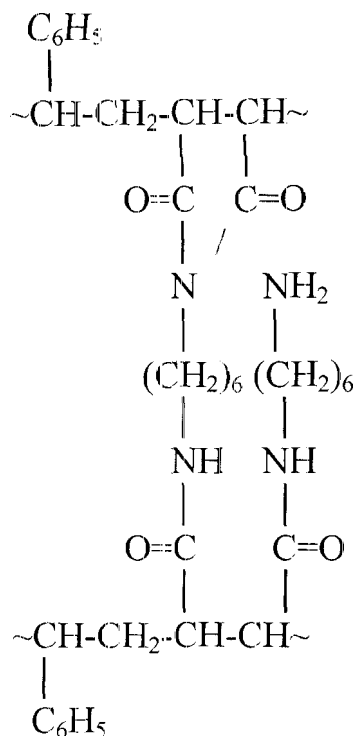
Немодифицированные полистирольные носители гидрофобны. Присоединением ионогенных групп в паразоложение бензольных радикалов можно придать ему некоторую гидрофильность, хотя, в целом, сохраняется склонность полимера к гидрофобным взаимодействиям.

Широкие возможности для разработки новых видов носителей открывает введение реакционноспособных ангидридных групп в состав синтетических полимеров. В этой связи отметим новый тип носителя, полученного сополимеризацией эквимольных количеств стирола и малеинового ангидрида:



Как правило, используют сополимер, сшитый гексаметилендиамином. Такие носители обладают довольно высокой вместимостью по отношению к белкам, могут применяться как для не ковалентной, так и ковалентной иммобилизации белков.

В присутствии избыточного количества диметилендиамина получают носитель, содержащий аминогруппы:

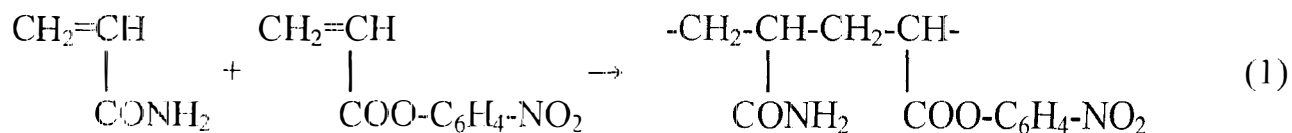


Полимеры на основе производных акриловой кислоты. Одним из многочисленных производных акриловой кислоты, широко применяющихся для получения полимерных гидрофильных носителей, является акриламид. Широкое распространение получил метод включения белков в полиакриламидный гель, получающийся при сополимеризации акриламида со сшивающим агентом N, N'-метилден-бис-акриламидом. Нити линейного полимера акриламида, сшитые N, N'-метилден-бис-акриламидом, образуют пространственную сетку геля, относительно жесткую, стойкую к химическим воздействиям. Процентное содержание полимера определяет пористость и жесткость геля.

Иногда применяют носители смешанного типа на основе полиакриламидного геля и агарозы под названием «ультрогели». Они представляют собой жесткую матрицу, создаваемой агарозой, с контролируемой пористостью, обеспечиваемой полиакриламидным гелем. Носители выпускаются в виде водной суспензии сферических гранул, применяются для нековалентной иммобилизации белков.

Для целей ковалентной иммобилизации белков полиакриламидный носитель активируют одним из способов: либо в готовый полимер вводят функциональные группы методом химической модификации, либо полимеризуют соответствующее функциональное производное мономера.

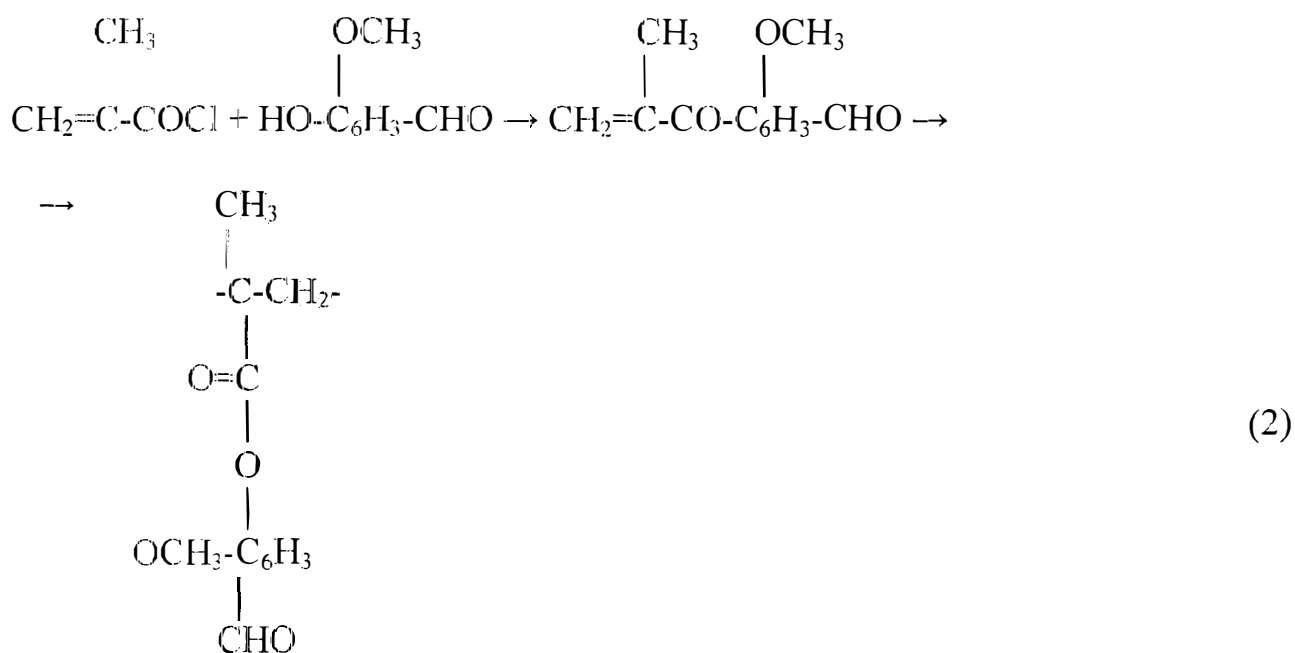
В качестве примера приведем реакцию сополимеризации акриламида и п-нитрофенилакрилата:



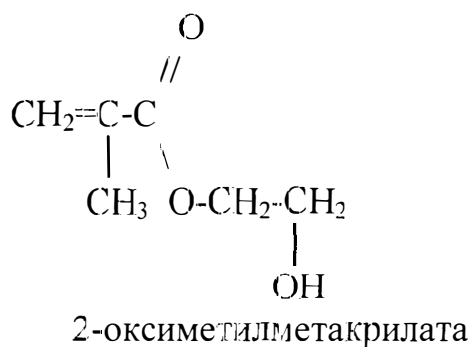
Способ полимеризации соединений, содержащий реакционноспособные группы, более удобен, так как позволяет избежать нежелательного изменения свойств (набухаемости, проницаемости) геля, возможного при модификации готового полимера.

В настоящее время создано большое число носителей на основе сополимеров акриламида с различными функциональными реакционноспособными группами.

Из других производных акриловой кислоты, применяющихся для получения полимерных носителей, следует назвать хлорангидрид метакриловой кислоты. При его взаимодействии, например, с ванилином образуется мономер, дающий при полимеризации соединение с высокореакционными альдегидными группами:

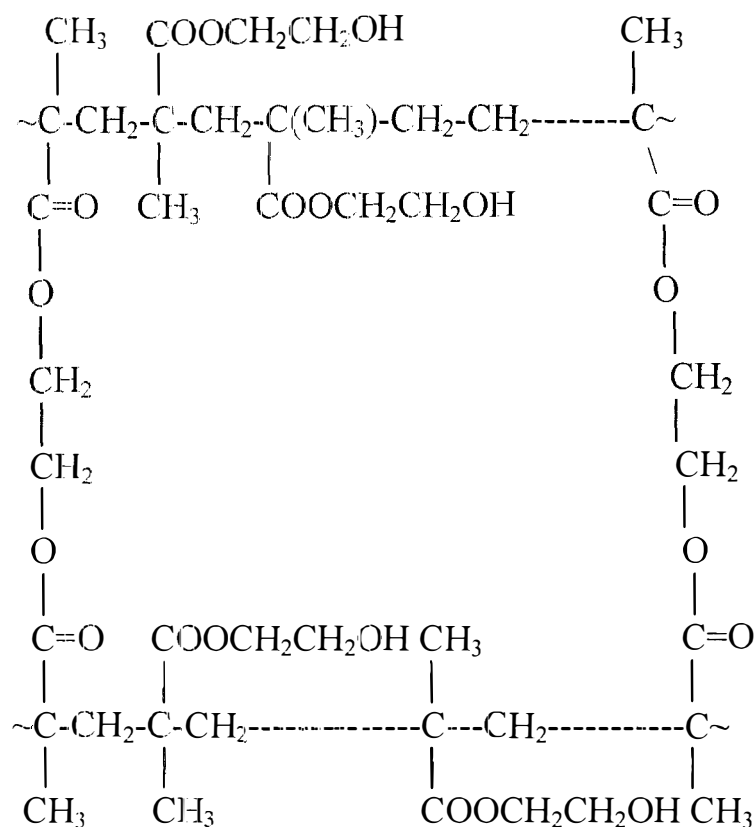


Большинство полимеров на основе акриловой кислоты не отличаются устойчивостью к воздействию многих химических реагентов, а также сильно набухают в воде и органических растворителях. Поэтому в некоторых случаях возникает необходимость в полимерных материалах, имеющих более жесткую структуру. К синтетическим полимерам с жесткой структурой относятся сополимеры производных акриловой кислоты, в частности



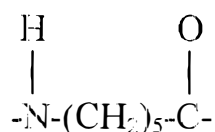


Макропористые полимерные гели на основе мономеров такого типа получают обычно в виде сферических гранул. Важными характеристиками этих материалов служат их гидрофильность, механическая прочность, химическая и биологическая стойкость, возможность использования органических растворителей - «сферон». Сфероны можно получить гетерогенной суспензионной сополимеризацией мономеров акрилата или метакрилата, содержащих гидроксильные группы, с диакрилатами и диметилметакрилатами в присутствии инертного растворителя. Схематически фрагмент структуры сополимера 2-оксиметилметакрилата, сшитого этилендиметакрилатом, можно представить следующим образом:



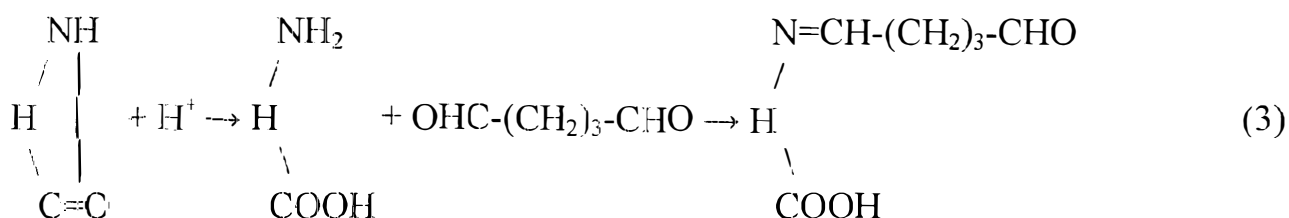
Изменяя соотношение концентраций исходных мономеров, можно в широких пределах изменять пористость, удельную поверхность и число активных гидроксильных групп сферона. Структура твердого макросетчатого геля сферона похожа на структуру силикагеля (гидрофобные углеводородные группы обращены внутрь полимера). В то же время наличие гидроксильных групп на поверхности придает матрице сходство с сефарозой и позволяет использовать разработанные для сефарозы методы активации носителя.

Полиамидные носители. Эта группа различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$. Один из способов их получения основан на гомополиконденсации аминокислот, например ϵ -аминокапроновой кислоты или ее лактама:



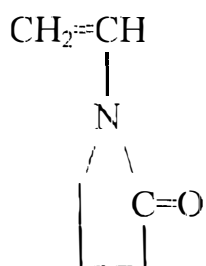
Помимо найлона-6 для иммобилизации используются полиизонитрилнаилон, полиаминоарилнаилон и др. Амидные группы придают полимерам гидрофильность.

Для использования в качестве носителей полиамиды активируют, частично гидролизуют, с последующей обработкой, например, глутаровым альдегидом:



Главным достоинством носителей этого типа является то, что они могут быть созданы в различной физической форме: в виде гранул, порошков, волокон, мембран, трубок и т.д.

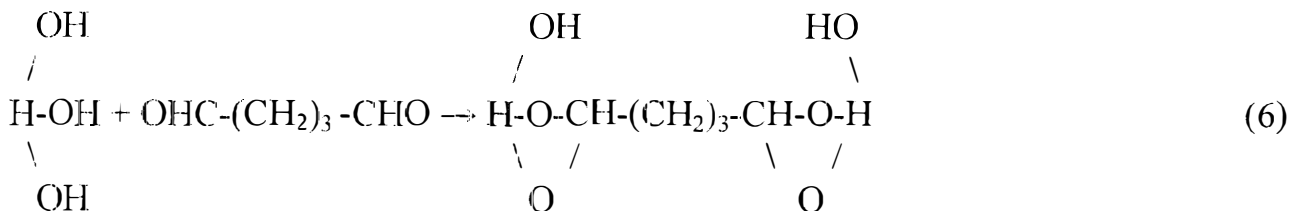
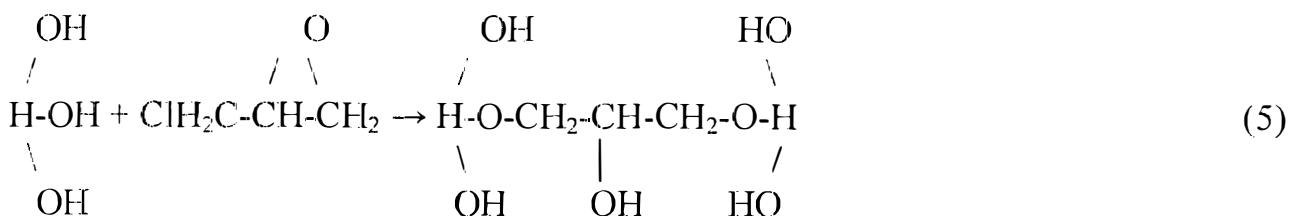
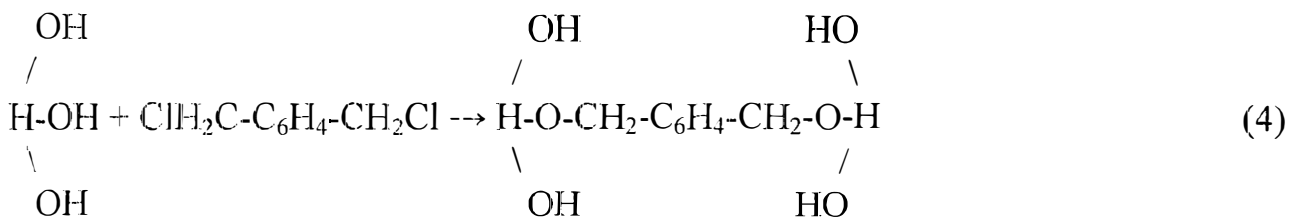
К группе полиамидных носителей следует отнести полимеры на основе N-винилпирролидона:



Широкое применение этих носителей, прежде всего для медицинских целей, обусловлено их биологической инертностью и стойкостью к воздействию биологической среды.

Носители на основе поливинилового спирта. Эти носители обладают высокой реакционной способностью. К достоинствам носителей на основе поливинилового спирта следует отнести, помимо высокого содержания реакционных групп, большую вместимость по отношению к белкам. Соответствующая обработка позволяет вводить в них различные функциональные группы: diazoизотиоциатные, альдегидные, хлоротриазинные, дисульфидные и др. для получения гидрофильных гелей

носители могут быть сшиты глутаровым альдегидом в кислой среде, а в щелочной – эпихлоргидрином или п-ксилилендихлоридом:



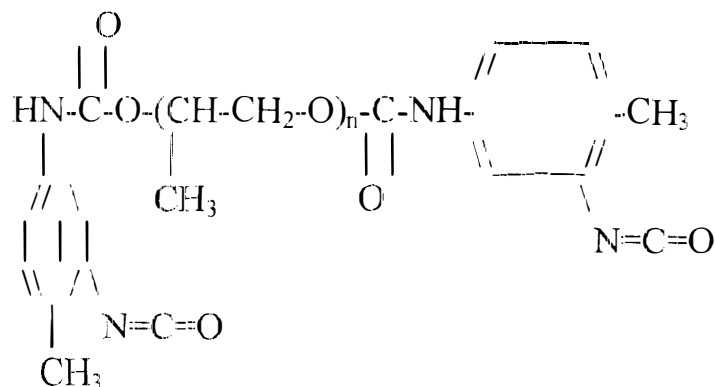
Таким образом, в практике в качестве белковых сорбентов применяются множество различных полимеров, отличающихся по физико-химическим свойствам и способностью к сорбции белковых молекул.

Полиуретаны. Гидрофильные полиуретановые полимеры, содержащие группировку -NH-CO- , - достаточно удобные материалы для включения

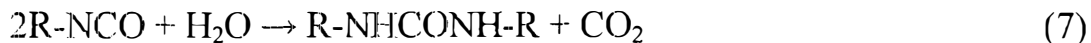


белков в гель; процедура иммобилизации в этом случае заключается в простом смешивании компонентов.

Полиуретаны образуются при взаимодействии изоцианатов (например, 2,4 и 2,6-толуилен-, гексаметилен- или дифенилметандиизоцианатов) с полиолами (гликолями, триолами, простыми и сложными олигоэфирами, содержащими OH-группы). Структуру одного из полимеров для получения полуретанового геля можно представить в следующем виде:



При полимеризации может происходить частичный гидролиз изоцианатных групп с выделением диоксида углерода. Образующиеся аминогруппы взаимодействуют с изоцианатными группами, поперечно сшивая полимер. Суммарную реакцию можно представить следующим образом:



Полиуретаны обладают большей стойкостью по отношению к воде и окислителям, чем полиамиды [70].

1.4 Методы сорбции белковых препаратов полимерными сорбентами

Иммобилизацию белка можно определить как включение молекулы белка в изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в ней молекулами субстрата, эффектора или ингибитора. Концентрации этих веществ измеряют в свободном растворе. Фаза белка обычно нерастворима в воде и часто представляет собой высокомолекулярный гидрофильный полимер. Включение в нее белка осуществляют различными способами: белок может быть ковалентно связан с этой фазой, адсорбирован на ней или физически включен в нее.

Адсорбция. В соответствии с вышеизложенным определением, в котором под иммобилизацией белка понимается его включение в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в последней молекулами субстрата или эффектора. Иными словами, иммобилизация представляет собой включение белка в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема. На основании этого определения все существующие методы физической иммобилизации можно разделить на четыре группы: 1) адсорбция на нерастворимых носителях; 2) включение в поры геля; 3) пространственное отделение белка от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки; 4) включение в двухфазную реакционную среду, где белок растворим и может находиться только в одной фазе.

Следует отметить, что адсорбция на нерастворимом носителе - это самый простой метод иммобилизации белков. Процедура иммобилизации состоит в смешивании при подходящих условиях белка и носителя, инкубации и отделении нерастворимого компонента смеси от растворимого центрифугированием или фильтрованием. Главный недостаток этого метода состоит в том, что белок может связываться с носителем недостаточно прочно. На такого рода связи влияют даже незначительные изменения экспериментальных условий: pH, ионной силы, температуры и природы растворителя, что может приводить к десорбции белка с носителя. Десорбцию белка может вызвать также субстрат. В идеальном случае иммобилизация белка не должна приводить к активности белков.

Ковалентное присоединение. Главными отличительными признаками методов иммобилизации является то, что путем химического воздействия на структуру белка в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между белком и носителем.

Препараты иммобилизованных белков, полученные с применением химических методов, обладают, по крайней мере, двумя важными достоинствами. Во-первых, ковалентная связь белка с носителем обеспечивает высокую прочность образуемого конъюгата. Иными словами, при достаточно широком варьировании условий, таких, как pH и температура, фермент не десорбируется с носителя. Это особенно важно при реализации процессов медицинского назначения. Во-вторых, химическая модификация белков способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких, как субстратная специфичность и стабильность. Именно химическими методами, путем многочисленного закрепления белковой структуры удается достигнуть наибольших эффектов стабилизации белковых препаратов.

Метод иммобилизации белков с помощью ковалентного связывания основан на образовании химической связи между молекулами белка и носителем. При этом важно, чтобы аминокислоты, необходимые для проявления активности белков, не участвовали в ковалентном связывании с носителем. Избежать этого, как правило, трудно, поэтому способ ковалентной иммобилизации обычно приводит к снижению активности. Однако инактивацию белка можно предотвратить, если проводить иммобилизацию в присутствии субстрата, который защищает активный центр. Для ковалентного присоединения носитель нужно предварительно активировать. Активированный носитель может реагировать с определенными группами молекулы белка: α - и ε -аминогруппами остатков лизина, а также функциональными группами остатков тирозина, гистидина, и цистеина.

Основные принципы конструирования препаратов ковалентно иммобилизованных белков. Для целей иммобилизации существует буквально неограниченный выбор синтетических полимеров и сополимеров. Одни из этих веществ могут быть использованы непосредственно в качестве носителей, другие предварительно должны быть подвергнуты специальной химической обработке активаторами или модифицирующими агентами. Иными словами, «химическая методология» иммобилизации не испытывает недостатка ни в выборе исходных материалов, ни в способах их трансформации. Однако все это составляет предмет и задачи тактики. Что же касается стратегической линии, то она базируется на принципах конструкции препарата, а таких принципов всего три.

Дело в том, что независимо от числа и химической природы компонентов, вовлеченных в процесс иммобилизации, числа и сложности отдельных стадий этого процесса, принципиально различающихся элементов-блоков химической конструкции не более трех элементов: Н-С-Б (как максимум) и двух Н-Б и С-Б. в свою очередь принципы конструирования соответствующих конъюгатов можно наглядно обозначить терминами «пришивка» (для Н-Б), «сшивка» (для Н-С-Б) и вшивка (для Н-Б).

Рассмотрим эти принципы более подробно. При наличии на поверхности носителя функциональных групп, способных вступать в химические реакции с функциональными группами белка с образованием ковалентных связей: получение иммобилизованного белка сводится к простой процедуре, аналогичной используемой для физической адсорбции белка на носителе. Методических различий здесь действительно нет: в раствор белка вводится носитель и белок на нем адсорбируется, однако адсорбция при химической иммобилизации необратима – белок пришивается к носителю одной или несколькими ковалентными связями. Тесный контакт белка с носителем может оказаться нежелательным, например, из-за неблагоприятного изменения микросреды белка, стерических и диффузионных ограничений. Выходом из такой ситуации становится отделение молекулы иммобилизованного белка от поверхности носителя на некоторое расстояние. Для этой цели применяются сшивающие реагенты различной длины. Они могут быть как простыми бифункциональными (т.е. с двумя одинаковыми или различными по химической природе реакционноспособными группами), так и весьма сложными полифункциональными реагентами, в том числе построенными из отличающихся по химической природе звеньев с различными по прочности связями между ними. Тем не менее, здесь используется один общий принцип ковалентной иммобилизации – сшивка белка с носителем посредством сшивающего агента.

По разнообразию методических приемов, по крайней мере за счет сшивающего агента, этот способ несравнимо богаче и гибче предыдущего. Во-вторых, подбором длины сшивающего агента (или подбором оптимальной смеси сшивающих агентов различной длины) Во-вторых, можно специально конструировать сшивку так, чтобы она содержала связь, лабильную в определенных условиях или специфическими реагентами.

Целый ряд разнообразных решений задачи ковалентной иммобилизации белков дает использование систем, изначально не содержащих носителя, а только белок и сшивающие агенты, где носитель формируется непосредственно в процессе иммобилизации или же сам белок служит одновременно и носителем. Речь, такими образом, пойдет здесь о ковалентном вшивании молекулы белка в различные типы сеток. Идея конструирования белковых сеток вытекает из полифункциональной природы самой молекулы белка, имеющей на поверхности помимо активного центра достаточно большое количество реакционноспособных групп. При введении достаточно большое количество реакционноспособных групп. При введении в раствор белка бифункционального сшивающего агента отдельные молекулы белка сшиваются друг с другом и образуют более или менее сложные агрегаты сетчатой структуры, в которой узлами служат сами молекулы белка [70, 71, 72].

Таким образом, существует большое количество методов иммобилизации белков на полимерных носителях, которые отличаются друг от друга способами связывания белка с носителем, условиями проведения иммобилизации, а также свойствами применяемого сорбента.

2 Патентный поиск

В результате патентного поиска было выполнено исследование объекта поиска по патентной и научно-технической литературе.

Глубина патентного поиска – 1994-2008 гг.

Поиск проведен по следующим материалам, изученным в ходе выполнения магистерской диссертации.

Известен способ приготовления лептоспирозного диагностикума для постановки реакции латекс-агглютинации. Изобретение относится к медицине, в частности к ветеринарии, а именно к иммунологии, и может использоваться для диагностики лептоспироза человека и животных. Способ обеспечивает раннее и быстрое обнаружение антигенов лептоспир и одновременное установление их серогрупповой принадлежности. Проводят адсорбцию одного из компонентов иммунного теста на поверхности микрокапсул латекса, используемых в качестве носителя, и предусматривают в процессе приготовления воздействие ультразвуковыми колебаниями на продукты адсорбции с последующими отмывкой, центрифугированием, инкубацией в холодильнике, добавлением консерванта и разливкой по флаконам. В качестве микросфер латекса используют карбоксилированные частицы, активированные карбодиимидом, при этом IgG-антитела к лептоспирам серогрупп *Canicola* и *Icterohemorrhagiae* адсорбируют на упомянутых частицах латекса путем обработки на ультразвуковой бане в течение $3 \pm 0,5$ мин с последующим встряхиванием при температуре 4 ± 1 °C и дальнейшей инкубации смеси при этой же температуре. Затем продукты адсорбции отмывают дистиллированной водой центрифугированием и к полученному осадку добавляют физиологический раствор до первоначального объема [Патент РФ № 2177617, МПК G01N33/567, G01N33/546, опубл. 27.12.2001].

Известен способ получения диагностикума для обнаружения дифтерийного токсина. Изобретение относится к медицинской микробиологии и касается получения диагностикума для обнаружения дифтерийного токсина. Сущность изобретения заключается в том, что в качестве носителя используют полимерный носитель, полученный методом анионной полимеризации мономера – акрилового альдегида в присутствии инициатора полимеризации едкого натрия и представляющий окрашенные монодисперсные частицы сферической формы диаметром $2 \pm 0,5$ мкм с реакционными альдегидными группами на поверхности частиц в количестве $1,3-1,6$ мкмоль/г носителя, отмывают носитель $0,1$ М карбонатным буферным раствором с pH $9,0-9,2$, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут и иммобилизацию проводят суспензированием отмытого носителя в $0,1$ М карбонатном буфере, pH $9,0-9,2$ и добавлением к нему дифтерийного антитоксического иммуноглобулина, оставляют для контакта в течение двух часов при 20 °C, охлаждают до 7 °C и выдерживают $16-18$ часов, стабилизацию проводят введением в суспензию 1 % раствора желатозы на $0,9$ % растворе хлорида натрия, оставляют при перемешивании при 20 °C в

течение двух часов, проводят лиофилизацию диагностикума, а обнаружение дифтерийного токсина осуществляют в реакции агломерации объемной. Преимущество изобретения заключается в повышении специфичности [Патент РФ № 2282192, МПК G01N33/569, G01N33/543, опубл. 20.08.2004].

Известен иммунодиагностикум на основе полистирольного латекса. Изобретение относится к области медицины, в частности к средствам экспресс-диагностики широкого спектра заболеваний, и представляет собой иммунодиагностикум на основе модифицированного полистирольного латекса, содержащий балластный белок для насыщения вакантных центров связывания, при этом содержит в качестве балластного белка α -казеин коровьего молока в равных объемах с модифицированным полистирольным латексом при концентрации α -казеина 0,4 мг/мл на основе модифицированного полистирольного латекса, содержащего в качестве балластного белка α -казеин коровьего молока. Данный иммунодиагностикум характеризуется пролонгированным сроком годности и высокой чувствительностью, позволяющей проводить определения в разбавленных пробах, что препятствует возникновению неспецифической агглютинации и обеспечивает получение достоверных результатов. В зависимости от природы иммобилизованного на поверхности латекса специфического белка может быть получен широкий спектр диагностикумов, предназначенных, например, для количественного определения продуктов деградации фибрина/фибриногена и ревматоидного фактора в сыворотке и в плазме крови человека [Патент РФ № 2231366, МПК А 61K51/08, G01N33/569, опубл. 27.06.2004].

Известен способ получения антигенного полимерного хеликобактерного диагностикума. Способ получения хеликобактерного антигенного диагностикума, включающий иммобилизацию антигенов с последующим обнаружением в сыворотке или плазме крови человека специфических иммуноглобулинов классов М, А, G к антигенам *Helicobacter pylori*, отличающийся тем, что растворимый хеликобактерный антиген, получают из клеточного лизата путем двойного разрушения бактериальных клеток, во-первых, обработкой 1 % раствором натрия дезоксихолата из расчета 0,5 мл раствора на 2,0 мл суспензии с концентрацией $(5-7) \cdot 10^{10}$ мк/мл, с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в термостате при температуре 40 °С в течение двух часов, во-вторых, проведением пяти циклов по 30 с ультразвуковой дезинтеграции, затем полученную взвесь осаживают центрифугированием при 8000 об/мин в течение 40 мин, при этом полученный клеточный лизат используют в качестве сенситина, который иммобилизуют на полимерный носитель с последующей его лиофилизацией, а обнаружение хеликобактерного возбудителя осуществляют реакцией агломерации объемной. В сенсите получают концентрацию белка в пределах 1,5-2 мг/мл с широким спектром иммуноглобулинов. В качестве носителя сенситина используют сферические полимерные частицы диаметром 1,5 мкм, содержащие 1,3 мМ/г альдегидных групп, при этом иммобилизацию микросфер лизатом осуществляют при использовании 0,1 М

карбонатного буферного раствора с рН 9,2. Блокирование свободных альдегидных групп проводят путем добавления к суспензии носителя с растворимым антигеном 2,0 мл 0,5 % раствора желатозы на 0,9 % растворе хлорида натрия и оставляют при постоянном перемешивании на мешалке в течение 120 мин при температуре 20 °С [Патент РФ № 2006116259, МПК G01N33/544, G01N33/531, опубл. 10.12.2007].

Известен способ получения латексного диагностикума для постановки реакции латекс-агглютинации. Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии, в частности к способу получения латексного диагностикума инфекционных заболеваний рогатого скота и птиц. Способ получения латексного диагностикума заключается в том, что полимерную суспензию центрифугируют, доводят дистиллированной водой концентрацию полимерной суспензии до 0,5 % по сухому остатку полимера, смешивают в равных объемах водные растворы вирусного антигена в инфекционном титре 6,5 Ig ТЦД/50мл (Тканевых Цитопатических Доз) и 0,5-1,0 %-ную полимерную суспензию, помещают в термостат при +36-38 °С на 4-6 ч. Затем к общему объему суспензии добавляют водный раствор человеческого сывороточного альбумина в концентрации 0,07-0,15 %, инкубируют при +4-8 °С в течение 11-13 часов, суспензию отмывают и доводят концентрацию диагностикума фосфатно-солевым буфером рН 7,2-7,4 до 0,1-0,3 %. Приготовленный диагностикум хранится при 4 °С до года. Диагностикум позволяет своевременно распознавать конкретные инфекционные заболевания и принять соответствующие своевременные меры лечения и профилактики [Патент № 2270449, МПК G01N33/531, опубл. 20.02.2006].

Известен способ экспресс-диагностики туберкулеза на основе реакции латекс-агглютинации. Изобретение относится к медицине, в частности к иммунологии, и касается способа экспресс-диагностики туберкулеза на основе реакции латекс-агглютинации. Способ включает инкубирование исследуемой неинaktivированной сыворотки крови с полистирольным латексом или полистирольным латексом с функциональными группами. Используют указанные латексы, сенсibilизированные антигеном ацетонвысушенных микобактерий, полученным методами диск-электрофореза в полиакриламидном геле или гель-хроматографии на сефакиле. При этом в качестве указанного антигена используют внутриклеточную цитоплазматическую белковую фракцию из *M.tuberculosis* или *M.africanum*. Способ прост, информативен, позволяет получить достоверные данные [Патент № 2130615, МПК G01N33/569, опубл. 20.05.1999].

Известен способ агглютинации частиц для одновременного исследования нескольких аналитов в одном образце. Изобретение относится к стабильному способу одновременного определения присутствия нескольких аналитов на основе агглютинации частиц [Патент № 2111488, МПК G01N33/483, G01N33/53, G01N33/546].

Таким образом, можно сделать вывод, что цель патентного поиска, поставленная в задании, достигнута. В результате исследования патентной литературы не было выявлено аналогов, предлагающих использовать в качестве полимерного сорбента белковых препаратов полиэтилен. Это дает нам возможность внести предложение использовать полиэтилен в качестве полимерного носителя антигенов различной природы для постановки реакции агглютинации в инфекционной и клинической иммунологии.

3 Экспериментальная часть

3.1 Материалы и методы исследований

Материалы. В работе использовали следующие вещества: яичный альбумин, карбонат натрия, гидрокарбонат натрия, глицин, соляная кислота, хлорид натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия.

Антигены. В работе использовали следующие антигены полисахаридной природы:

1. АГ *Tr. fariforme*;
2. АГ *Tr. verrucosum*;
3. АГ *Tr. fariforme*;
4. АГ *Tr. autotrophycum*;
5. АГ *Tr. fariforme*;
6. АГ *Tr. autotrophycum*;
7. АГ *Tr. sarkisovii*;
8. АГ *Tr. sarkisovii*.

Полимерные сорбенты. В работе использовали следующие полимеры: полиэтилен, полистирол, поливинилхлорид, полиметилметакрилат.

Оборудование. Использовали следующее оборудование: фотоэлектроклориметр ФЭК-1, мерные колбы на 1 л и 50 мл, пипетка на 5 мл, колбы.

Методы исследования. В первой части экспериментальной работы выполнена сорбция яичного альбумина различными полимерными сорбентами в различных средах. Инкубацию белка с полимерным сорбентом проводили в течение одного часа при комнатной температуре при непрерывном перемешивании с использованием буферных растворов: карбонатно-бикарбонатный раствор pH 9,2-9,4, глициносолянокислый pH 4,2-4,6 и фосфатно-буферный раствор pH 6,8-7,2. В качестве полимерных носителей использовали полиэтилен, полистирол, поливинилхлорид, полиметилметакрилат. Сорбционную способность полимеров определяли по изменению оптической плотности раствора белка до сорбции полимером и реакционной смеси после инкубации с полимерным сорбентом.

Для определения оптической плотности использовали колориметрический метод анализа, который основан на измерении интенсивности светового потока, прошедшего через окрашенный раствор. Суть метода заключается в том, что существует зависимость между интенсивностью окраски раствора и содержанием в этом растворе окрашенного вещества. При этом световой поток проходит через кювету, наполненную испытуемым окрашенным раствором. Прошедший через раствор световой поток воспринимается фотоэлементом, в котором световая энергия превращается в электрическую. Возникающий при этом электрический ток измеряют при помощи гальванометра.

Во второй части проведено изучение степени сорбции антигенов различной природы полимерным сорбентом. Инкубацию антигенов с полимерным сорбентом проводили в течение одного часа при комнатной температуре при непрерывном перемешивании в присутствии фосфатно-

буферного раствора pH 6,8-7,2. в качестве полимерного носителя применяли полистирол. Для определения способности сорбента связывать различные антигены измеряли оптическую плотность реакционной смеси до и после сорбции по описанной выше методике.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами. Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятности Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала. В качестве достоверного интервала был выбран уровень вероятности $P=0,95$ (уровень значимости $p<0,05$).

3.2 Сорбция яичного альбумина на полимерных сорбентах в различных средах

3.2.1 Сорбция яичного альбумина на полимерных сорбентах в различных средах

Ход работы. Перед началом исследований готовили буферные растворы с различным значением pH:

- 0,1 М карбонатно-бикарбонатный буферный раствор pH 9,2-9,4: смешивали 10 мл 1 М карбоната натрия ($106 \text{ г Na}_2\text{CO}_3$ в 1 л) и 90 мл 1 М гидрокарбоната натрия (84 г NaHCO_3 в 1 л) и объем доводили до 1 л дистиллированной водой;

- глициносолянокислый буферный раствор pH 4,2-4,6: 925 мл 0,1 н раствора глицина ($7,507 \text{ г NH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 5,85 \text{ г NaCl}$ в 1 л) доводили до 1 л 0,1 н раствором соляной кислоты;

- фосфатно-буферный раствор pH 6,8-7,2: 492 мл 1/15 М раствора гидрофосфата натрия ($11,866 \text{ г Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 1 л) доводили 1/15 М раствором дигидрофосфата калия ($9,073 \text{ г KH}_2\text{PO}_4$ в 1 л) до 1 л.

Яичный белок высушивали в сушильном шкафу при температуре, не превышающей 60°C , затем растирали в ступке до порошкообразной консистенции. Из полученного порошка готовили раствор белка с концентрацией 40 мг/мл. Для этого на аналитических весах брали навеску высушенного белка массой 2,0 г, помещали в мерную колбу на 50 мл и доводили до метки дистиллированной водой. Содержимое колбы тщательно перемешивали и отфильтровывали в другую колбу.

В девять пронумерованных колб наливали по 2 мл раствора белка альбумина и по 2 мл буферного раствора: в колбы № 1, 4, 7 - карбонатно-бикарбонатный буферный раствор, в колбы № 2, 5, 8 - глициносолянокислый буферный раствор и в колбы № 3, 6, 9 - фосфатно-буферный раствор. Затем содержимое колб тщательно перемешивали и с помощью фотоколориметра определяли оптическую плотность белкового раствора при длине волны 397 нм.

После того, как измерили оптическую плотность раствора белка с буферным раствором, в каждую колбу добавили по 0,5 г полимера: в колбы № 1, 2, 3 - полистирол, в колбы № 4, 5, 6 - полиметилметакрилат в колбы № 7, 8, 9 - поливинилхлорид. Полимер использовали в виде гранул размером 0,5 мм. Сорбцию белка полимерным сорбентом производили в течение 1 часа при комнатной температуре и непрерывном перемешивании реакционной смеси. По истечении

одного часа сорбент декантировали и измеряли оптическую плотность надосадка по описанной выше методике.

Опыт повторяли три раза.

Результаты. Полученные результаты оптической плотности раствора яичного альбумина с буферным раствором до и после сорбции различными полимерными носителями представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Оптическая плотность яичного альбумина с буферным раствором

Полимерный сорбент	Буферный раствор	Оптическая плотность яичного альбумина	
		до сорбции полимером	после сорбции полимером
Полистирол	Карбонатно-бикарбонатный	0,020	0,010
		0,020	0,0075
		0,0175	0,010
	Глициносолянокислый	0,020	0,010
		0,0175	0,0075
		0,020	0,010
	Фосфатно-буферный	0,0175	0,010
		0,020	0,005
		0,0175	0,005
Полиметилметакрилат	Карбонатно-бикарбонатный	0,025	0,005
		0,025	0,0075
		0,020	0,005
	Глициносолянокислый	0,020	0,01
		0,020	0,0075
		0,025	0,01
	Фосфатно-буферный	0,02	0,01
		0,0175	0,0075
		0,02	0,01
Поливинилхлорид	Карбонатно-бикарбонатный	0,0175	0,01
		0,0175	0,005
		0,02	0,01
	Глициносолянокислый	0,0175	0,01
		0,0175	0,01
		0,02	0,0075
	Фосфатно-буферный	0,025	0,010
		0,020	0,005
		0,025	0,005

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что наилучшая сорбция яичного альбумина полистиролом произошла в присутствии фосфатно-буферного раствора, полиметилметакрилатом – карбонатно-бикарбонатного раствора, а поливинилхлоридом – фосфатно-буферного раствора.

Это показывает что, лучший результат сорбции белковых препаратов различными полимерными носителями протекает в среде фосфатно-буферного раствора. При сравнении сорбционной способности различных полимеров можно сделать вывод что, лучшим сорбентом в данном случае является полиметилметакрилат.

Обработка результатов. Определение средней величины и квадратичных отклонений.

Средние величины оптической плотности определяли по формуле

$$X = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}, \quad (1)$$

где x — значение отдельного признака; X - средняя арифметическая величина; n – общее число случаев.

Подставляли в формулу (1) отдельные значения оптической плотности и получали их средние величины

Результаты вычисления среднеарифметических значений оптической плотности представлены в виде таблицы 2.

Таблица 2 – Среднеарифметические значения оптической плотности яичного альбумина с буферным раствором до и после сорбции полимером

Полимерный сорбент	Буферный раствор	Оптическая плотность яичного альбумина	
		до сорбции полимером	после сорбции полимером
Полистирол	Карбонатно-бикарбонатный	0,0192	0,0092
	Глициносолянокислый	0,0192	0,0092
	Фосфатно-буферный	0,0183	0,007
Полиметилметакрилат	Карбонатно-бикарбонатный	0,0230	0,0058
	Глициносолянокислый	0,0220	0,0092
	Фосфатно-буферный	0,0192	0,0092
Поливинилхлорид	Карбонатно-бикарбонатный	0,0230	0,0083
	Глициносолянокислый	0,0183	0,0092
	Фосфатно-буферный	0,025	0,0070

Средняя арифметическая величина является важной характеристикой признака. Но при одной и той же средней величине наблюдаемые отклонения могут варьировать в разной степени. Поэтому необходимо ввести показатель колеблемости признака. Таким показателем является среднее квадратичное отклонение, которое определяли по формуле

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - X)^2}{n - 1}}, \quad (2)$$

где в числителе – сумма квадратов отклонений значений от средней арифметической, в знаменателе – число степеней свободы, равное числу наблюдений без одного.

Соответствующие расчеты средних квадратических отклонений для оптической плотности яичного альбумина до и после сорбции полимерным носителем представлены в таблицах 3, 4

Таблица 3 – Расчеты средних квадратических отклонений для оптической плотности яичного альбумина до и после сорбции полимерным носителем

Полимерный сорбент	Буферный раствор	сумма квадратов отклонений значений от средней арифметической,			
		до сорбции полимером		после сорбции полимером	
		$x-X$	$(x-X)^2$	$x-X$	$(x-X)^2$
Полистирол	Карбонатно-бикарбонатный	+0,0008	0,0000008	+0,0008	0,0000006
		+0,0008	0,0000008	-0,0017	0,0000028
		-0,0017	0,0000028	+0,0008	0,0000006
	Глицино солянокислый	+0,0008	0,0000006	+0,0008	0,0000006
		-0,0017	0,0000028	-0,0017	+0,0000028
		+0,0008	0,0000006	+0,0008	0,0000006
	Фосфатно-буферный	-0,0008	0,0000006	+0,003	0,000009
		+0,0017	0,0000028	-0,002	0,000004
		-0,0008	0,0000006	-0,002	0,000004
Полиметилметакрилат	Карбонатно-бикарбонатный	+0,002	0,000004	-0,0008	0,0000006
		+0,002	0,000004	-0,0017	0,0000028
		-0,003	0,000009	-0,0008	0,0000006
	Глицино солянокислый	-0,002	0,000004	+0,0008	0,0000006
		-0,002	0,000004	-0,0017	0,0000028
		+0,003	0,000009	+0,0008	0,0000006
	Фосфатно-буферный	+0,0008	0,0000006	+0,0008	0,0000006
		+0,0008	0,0000006	-0,0017	0,0000028
		-0,0017	0,0000028	+0,0008	0,0000006
Поливинилхлорид	Карбонатно-бикарбонатный	-0,0008	0,0000006	+0,0017	0,0000028
		-0,0017	0,0000028	-0,0033	0,0000108
		-0,0008	0,0000006	+0,0017	0,0000028
	Глицино солянокислый	-0,0008	0,0000006	+0,0008	0,0000006
		-0,0008	0,0000006	0,0017	0,0000028
		+0,0017	0,0000028	+0,0008	0,0000006
	Фосфатно-буферный	+0,002	0,000004	-0,003	0,000009
		-0,003	0,000009	+0,002	0,000004
		+0,002	0,000004	+0,002	0,000004

Таблица 4 – Средние квадратические отклонения для оптической плотности яичного альбумина до и после сорбции полимерным носителем

Полимерный сорбент	Буферный раствор	Среднее квадратическое отклонение	
		до сорбции	после сорбции
Полистирол	Карбонатно-бикарбонатный	0,0014	0,0014
	Глицино солянокислый	0,0011	0,0014
	Фосфатно-буферный	0,0011	0,0029
Полиметилметакрилат	Карбонатно-бикарбонатный	0,0029	0,0014
	Глицино солянокислый	0,0029	0,0014
	Фосфатно-буферный	0,0014	0,0016
Поливинилхлорид	Карбонатно-бикарбонатный	0,0011	0,0078
	Глицино солянокислый	0,0014	0,0014
	Фосфатно-буферный	0,0029	0,0029

Определение достоверности различий по критерию t-Стюдента. Получив средние величины и квадратические отклонения, можно определить достоверность различий между двумя обследованными группами по критерию t-Стюдента.

С этой целью применяли формулу

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}, \quad (3)$$

где X – средняя величина; m – ошибка средней величины.

Ошибку средней величины рассчитывали по формуле

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

В большинстве исследований достоверность считается доказанной при 95 %-ном уровне значимости. Это свидетельствует о том, что различия средних величин возникли в результате недостатка числа наблюдений, составляющих меньше 5 % в таких случаях говорят, что вероятность ошибки p меньше 5 %.

Расчеты ошибки средней величины и критерия t-Стюдента представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Ошибка средней величины и критерия t-Стьюдента

Полимерный сорбент	Буферный раствор	Ошибка средней величины		Критерий t-Стьюдента
		до сорбции	после сорбции	
Полистирол	Карбонатно-бикарбонатный	0,0006	0,0008	10,54
	Глицино солянокислый	0,0006	0,0008	10,54
	Фосфатно-буферный	0,0006	0,0016	20,63
Полиметилметакрилат	Карбонатно-бикарбонатный	0,0017	0,0008	9,33
	Глицино солянокислый	0,0017	0,0008	9,33
	Фосфатно-буферный	0,0008	0,0009	8,45
Поливинилхлорид	Карбонатно-бикарбонатный	0,0006	0,0045	2,21
	Глицино солянокислый	0,0006	0,0008	9,59
	Фосфатно-буферный	0,0017	0,0016	9,95

Для того чтобы определить достоверность различий, необходимо обратиться к специальной таблице [73], в которой представлены граничные значения критерия t-Стьюдента для 5 %-ного уровня значимости в зависимости от числа степеней свободы.

В нашем случае число степеней свободы определяли по формуле

$$n = (n_1 + n_2) - 2$$

$$n = (3 + 3) - 2 = 4$$
(5)

Из таблицы [73] видно, что граничным значением для числа степеней свободы, равным 4, является 2,78. Найденные значения критерия t-Стьюдента значительно превосходят эту величину, следовательно, обнаруженные нами различия в оптической плотности яичного альбумина до сорбции и после сорбции полимером достоверны.

3.2.2 Сорбция яичного альбумина на полиэтилене в различных средах

Ход работы. В данном опыте использовали буферные растворы, приготовленные в предыдущем опыте.

Готовили 50 мл раствора яичного альбумина с концентрацией 40 мг/мл. В три колбы наливали по 3 мл раствора яичного альбумина и по 3 мл буферного раствора: в колбу № 1 добавляли карбонатно-бикарбонатный буферный раствор, в колбу № 2

– глициносолянокислый буферный раствор и в колбу № 3 – фосфатно-буферный раствор. Затем содержимое колб тщательно перемешивали и с помощью фотоколориметра определяли оптическую плотность белкового раствора при длине волны 397 нм по выше описанной методике.

После того, как измерили оптическую плотность раствора белка с буферным раствором в каждую колбу добавляли по 0,75 г полимера. В качестве полимерного сорбента использовали гранулы полиэтилена размером 0,5 мм. Сорбцию белка полимерным сорбентом производили в течение 1 часа при комнатной температуре и непрерывном перемешивании реакционной смеси. По истечении одного часа сорбент декантировали и измеряли оптическую плотность надосадка по описанной выше методике.

Опыт повторяли три раза.

Результаты. Результаты измерения оптической плотности раствора белка с буферным раствором до сорбции и после сорбции представлены в виде таблицы 6.

Таблица 6 -- Оптическая плотность раствора яичного альбумина с буферным раствором

Буферный раствор	Оптическая плотность раствора яичного альбумина	
	до сорбции полимером	после сорбции полимером
карбонатно-бикарбонатный	0,097	0,064
	0,078	0,092
	0,062	0,049
глициносолянокислый	0,079	0,095
	0,088	0,075
	0,104	0,071
фосфатно-буферный раствор	0,085	0,052
	0,08	0,062
	0,05	0,042

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что полиэтилен обладает сорбционными способностями по отношению к белковым препаратам, причем наилучшая сорбция яичного альбумина полиэтиленом протекает в среде фосфатно-буферного раствора.

Обработка результатов. Определение средней величины и квадратических отклонений.

Средние величины оптической плотности яичного альбумина определяли по формуле (1). Подставляли в формулу отдельные значения оптической плотности и получали их средние величины.

Результаты вычисления среднеарифметических значений оптической плотности яичного альбумина до и после сорбции полиэтиленом представлены в виде таблицы 7.

Таблица 7 – Расчеты среднеарифметических значений оптической плотности

Буферный раствор	Оптическая плотность раствора яичного альбумина	
	до сорбции полимером	после сорбции полимером
карбонатно-бикарбонатный	0,079	0,068
глициносолянокислый	0,090	0,080
фосфатно-буферный раствор	0,072	0,052

Средняя арифметическая величина является важной характеристикой признака. Но необходимо ввести показатель колеблемости признака. Таким показателем является среднее квадратичное отклонение, которое находили по формуле (2).

Производили соответствующие расчеты, результаты которых представлены в таблицах 8, 9.

Таблица 8 – Расчеты средних квадратичных отклонений для оптической плотности яичного альбумина до и после сорбции полиэтиленом

Буферный раствор	Сумма квадратов отклонений значений от средней арифметической			
	до сорбции полимером		после сорбции полимером	
	$x-X$	$(x-X)^2$	$x-X$	$(x-X)^2$
карбонатно-бикарбонатный	+0,018	0,000324	-0,004	0,000016
	-0,001	0,000001	+0,024	0,000576
	-0,017	0,000289	-0,003	0,000009
глициносолянокислый	-0,011	0,000121	+0,015	0,000225
	-0,002	0,000004	-0,005	0,000025
	+0,014	0,000196	-0,009	0,000081
фосфатно-буферный	+0,013	0,00169	0	0
	+0,008	0,000064	+0,010	0,0001
	-0,022	0,000484	-0,010	0,0001

Таблица 9 – Расчеты средних квадратических отклонений для оптической плотности яичного альбумина до и после сорбции полиэтиленом

Буферный раствор	Среднее квадратическое отклонение для оптической плотности яичного альбумина	
	до сорбции полиэтиленом	после сорбции полиэтиленом
карбонатно-бикарбонатный	0,018	0,017
глициносолянокислый	0,010	0,013
фосфатно-буферный	0,019	0,010

Определение достоверности различий по критерию t-Стьюдента. Получив средние величины и квадратические отклонения, можно определить достоверность различий между двумя обследованными группами по критерию t-Стьюдента.

С этой целью применяли формулу (3). Ошибку средней величины рассчитывали по формуле (4).

Расчеты ошибки средней величины и критерия t-Стьюдента представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Ошибка средней величины и критерия t-Стьюдента

Буферный раствор	Ошибка средней величины		Критерий t-Стьюдента
	до сорбции	после сорбции	
карбонатно-бикарбонатный	0,010	0,010	0,78
глициносолянокислый	0,006	0,008	1,00
фосфатно-буферный	0,011	0,006	2,91

Для того чтобы определить достоверность различий, необходимо обратиться к специальной таблице [73], в которой представлены граничные значения критерия t-Стьюдента для 5 %-ного уровня значимости в зависимости от числа степеней свободы.

Из таблицы [73] видно, что граничным значением для числа степеней свободы, равным 4, является 2,78. Найденные значения критерия t-Стьюдента в первых двух случаях несколько ниже, поэтому уровень достоверности составляет выше 5 %, а в последнем случае значительно превосходят эту величину, следовательно, обнаруженные нами различия в оптической плотности до сорбции и после сорбции полимером в среде фосфатно-буферного раствора достоверны.

3.3 Изучение степени сорбции антигенов различной природы полимерным сорбентом

Ход работы. В десять пронумерованных колб наливали по 3 мл буферного раствора и по 3 мл раствора антигена. В качестве буферного раствора использовали фосфатно-буферный раствор. Затем содержимое колб тщательно перемешивали и с помощью фотоколориметра определяли оптическую плотность раствора при длине волны 397 нм по выше описанной методике.

После того, как измерили оптическую плотность раствора антигена с буферным раствором, в каждую колбу добавляли по 0,75 г полимерного сорбента. В качестве полимерного сорбента использовали полиэтилен. Сорбцию белка полимерным сорбентом производили в течение 1 часа при комнатной температуре и непрерывном перемешивании реакционной смеси. По истечении одного часа сорбент декантировали и измеряли оптическую плотность надосадка по описанной выше методике.

Результаты. Результаты измерения оптической плотности раствора антигена с буферным раствором до сорбции и после сорбции представлены в виде таблицы 11.

Таблица 11 – Оптическая плотность раствора белка с буферным раствором

№	Антиген	Оптическая плотность раствора антигена	
		до сорбции полимером	после сорбции полимером
1	АГ Tr. fariforme	0,038	0,010
		0,040	0,009
		0,035	0,012
2	АГ Tr. verrucosum	0,045	0,049
		0,041	0,046
		0,037	0,041
3	АГ Tr. fariforme	0,049	0,067
		0,046	0,059
		0,050	0,065
4	АГ Tr. verrucosum	0,065	0,023
		0,060	0,033
		0,055	0,028
5	АГ Tr. fariforme	0,070	0,024
		0,072	0,022
		0,068	0,019
6	АГ Tr. autotrophycum	0,046	0,040
		0,050	0,036
		0,045	0,041
7	АГ Tr. fariforme	0,034	0,012
		0,035	0,014
		0,037	0,010
8	АГ Tr. autotrophycum	0,161	0,090
		0,158	0,087
		0,164	0,083
9	АГ Tr. sarkisovii	0,057	0,033
		0,055	0,036
		0,062	0,031
10	АГ Tr. sarkisovii	0,087	0,070
		0,091	0,068
		0,095	0,062

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что полиэтилен обладает сорбционными способностями по отношению к антигенам различной природы, за исключением таких антигенов, как АГ Tr. verrucosum, АГ Tr. fariforme.

Обработка результатов. Определение средней величины и квадратических отклонений. Средние величины оптической плотности находили по формуле (1). Подставляли в формулу отдельные значения оптической плотности и получали их средние величины

Результаты вычисления среднеарифметических значений оптической плотности представлены в виде таблицы 12.

Таблица 12 – Оптическая плотность раствора антигена с буферным раствором

№	Антиген	Оптическая плотность раствора антигена	
		до сорбции полимером	после сорбции полимером
1	АГ Tr. fariforme	0,038	0,010
2	АГ Tr. verrucosum	0,041	0,045
3	АГ Tr. fariforme	0,048	0,064
4	АГ Tr. verrucosum	0,060	0,028
5	АГ Tr. fariforme	0,070	0,022
6	АГ Tr. autotrophycum	0,047	0,039
7	АГ Tr. fariforme	0,035	0,012
8	АГ Tr. autotrophycum	0,161	0,087
9	АГ Tr. sarkisovii	0,058	0,033
10	АГ Tr. sarkisovii	0,091	0,067

Средняя арифметическая величина является важной характеристикой признака. Но ввели показатель колеблемости признака. Таким показателем является среднее квадратичное отклонение, которое находили по формуле (2).

Соответствующие расчеты представлены в таблицах 13, 14.

Таблица 13 – Расчеты средних квадратичных отклонений для оптической плотности раствора антигена до и после сорбции полиэтиленом

№	Антиген	Сумма квадратов отклонений значений от средней арифметической			
		до сорбции полиэтиленом		после сорбции полиэтиленом	
		$x-X$	$(x-X)^2$	$x-X$	$(x-X)^2$
1	2	3	4	5	6
1	АГ Tr. fariforme	0	0	+	0
		+0,002	0,000004	-0,001	0,000001
		-0,003	0,000009	+0,002	0,000004
2	АГ Tr. verrucosum	+0,007	0,000049	+0,002	0,000004
		+0,002	0,000004	0	0
		-0,008	0,000064	-0,003	0,000009
3	АГ Tr. fariforme	0	0	+0,002	0,000004
		+0,002	0,000004	0	0
		-0,002	0,000004	+0,003	0,000009
4	АГ Tr. autotrophycum	-0,001	0,000001	+0,001	0,000001
		+0,003	0,000009	-0,002	0,000004
		-0,002	0,000004	+0,002	0,000004
5	АГ Tr. fariforme	-0,001	0,000001	0	0
		0	0	+0,002	0,000004
		+0,002	0,000004	-0,002	0,000004

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6
		0	0	+0,003	0,000009
6	АГ Tr. autotrophycum	-0,003	0,000009	0	0
		+0,003	0,000009	+0,004	0,000016
7	АГ Tr. sarkisovii	-0,001	0,000001	0	0
		-0,003	0,000009	+0,003	0,000009
		0,004	0,000016	-0,002	0,000004
8	АГ Tr. sarkisovii	+0,004	0,000016	+0,003	0,000009
		0	0	+0,001	0,000001
		+0,004	0,000016	-0,005	0,000025

Таблица 14 – Средние квадратические отклонения для оптической плотности раствора антигена до и после сорбции

№	Антиген	Средние квадратические отклонения	
		до сорбции	после сорбции
1	АГ Tr. fariforme	0,025	0,0016
2	АГ Tr. verrucosum	0,0076	0,0025
3	АГ Tr. fariforme	0,0020	0,0025
4	АГ Tr. autotrophycum	0,0026	0,0021
5	АГ Tr. fariforme	0,0016	0,0020
6	АГ WJ . autotrophycum	0,0030	0,0035
7	АГ Tr. sarkisovii	0,0036	0,0025
8	АГ Tr. sarkisovii	0,0040	0,0040

Определение достоверности различий по критерию t-Стюдента. Получив средние величины и квадратические отклонения, определяли достоверность различий между двумя обследованными группами по критерию t-Стюдента.

С этой целью можно применяли формулы (3) и (4).

В большинстве исследований достоверность считается доказанной при 95 %-ном уровне значимости. Это свидетельствует о том, что различия средних величин возникли в результате недостатка числа наблюдений, составляющих меньше 5 %.

Расчеты ошибки средней величины и критерия t-Стюдента представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Расчеты ошибки средней величины и критерия t-Стюдента

№	Антиген	Ошибка средней величины		Критерий t-Стюдента
		до сорбции	после сорбции	
1	2	3	4	5
1	АГ Tr. fariforme	0,0014	0,0005	19,32
2	АГ Tr. verrucosum	0,0044	0,0014	1698,1
3	АГ Tr. fariforme	0,0012	0,0014	14545
4	АГ Tr. autotrophycum	0,0015	0,0012	4,22
5	АГ Tr. fariforme	0,0009	0,0012	15,51

1	2	3	4	5
6	АГ Tr. autotrophycum	0,0017	0,002	28,38
7	АГ Tr. sarkisovii	0,0021	0,0014	9,96
8	АГ Tr. sarkisovii	0,0020	0,0020	8,49

Для определения достоверности различий, обратились к специальной таблице [73], в которой представлены граничные значения критерия t-Стьюдента для 5 %-ного уровня значимости в зависимости от числа степеней свободы.

Из таблицы [73] видно, что граничным значением для 4 является 2,78. Найденные значения критерия t-Стьюдента значительно превосходят эту величину, следовательно, обнаруженные нами различия в оптической плотности до сорбции и после сорбции полимером достоверны.

3.4 Интерпретация полученных результатов

Приведенные результаты свидетельствуют о возможности осуществления иммобилизации белковых препаратов, в частности яичного альбумина и антигенов различной природы, полимерным сорбентом в различных средах.

В первой части исследовательской работы получены данные иммобилизации яичного альбумина различными полимерными сорбентами, а именно полистиролом, поливинилхлоридом и полиметилметакрилатом. Следует отметить, что в этом опыте исследовали полимеры, применяемые в инфекционной и клинической иммунологии для постановки реакции агглютинации латекса. Сравнив полученные значения оптической плотности раствора яичного альбумина до сорбции и после инкубации с полимерным сорбентом, можно сделать вывод, что наилучшая сорбция яичного альбумина полимером произошла в среде фосфатно-буферного раствора. Причем наилучшим сорбентом в данном случае является полиметилметакрилат.

Во второй части нашей экспериментальной работы получены данные сорбции яичного альбумина в различных средах полиэтиленом, который ранее не применялся в качестве носителей белковых препаратов. Наиболее эффективно сорбция яичного альбумина полиэтиленом протекает в среде фосфатно-буферного раствора.

В заключительной части эксперимента было проведено исследование сорбционной способности полиэтилена связывать антигены различной природы в присутствии фосфатно-буферного раствора. Полученные результаты показали, что антигены сорбируются на полиэтилене и данный синтетический материал можно использовать в качестве сорбента антигенов и антител. Но, следует отметить, что не все антигены можно иммобилизовать на полиэтилене. Так, не произошла сорбция на полиэтилене следующих антигенов: АГ Tr. verrucosum, АГ Tr. fariforme

Таким образом, была показана возможность использования полимерных сорбентов при конструировании различных иммунодиагностических тест-систем для обнаружения антигенов и антител.

4 Выводы

1. В результате исследовательской работы доказана возможность использования различных полимерных сорбентов для иммобилизации белковых и полисахаридных препаратов, а именно полиэтилена, полистирола, поливинилхлорида и полиметилметакрилата;
2. Оптимальным носителем белковых препаратов из ранее известных полимерных сорбентов является полиметилметакрилат, причем наилучшая сорбция протекает в среде фосфатно-буферного раствора..
3. Оптимальным носителем для полисахаридов является полиэтилен в присутствии фосфатно-буферного раствора.
4. Предложенный нами носитель можно использовать при конструировании иммунодиагностических тест-систем для постановки реакции агглютинации латекса.

Заключение

Задачей настоящей магистерской диссертации было изучение возможности использования полимерных сорбентов для иммобилизации белковых препаратов.

В литературном обзоре был произведен анализ существующих методов, используемых для диагностики инфекционных заболеваний, из которых мы выбрали латексный метод. Так как возможность использования в данном методе в качестве сорбентов антигенов и антител различные синтетические материалы, расширяет возможности применения реакции агглютинации латекса в инфекционной и клинической иммунологии. Также преимуществом данного метода является простота постановки реакции, быстрота ее выполнения, отсутствие необходимости в сложной аппаратуре.

В ходе патентного поиска изучены способы приготовления различных иммунодиагностических тест-систем для обнаружения антигенов и антител с использованием таких полимерных сорбентов, как полистирол, поливиниловый спирт. Полученный при этом материал послужил основой для разработки иммунодиагностикума с применением в качестве полимерного носителя полиэтилена.

В экспериментальной части собственные исследования разделены на три этапа.

На первом этапе проведена сорбция яичного альбумина полимерными сорбентами в различных средах. В качестве полимерных сорбентов использовали полистирол, поливинилхлорид, полиметилметакрилат.

На втором этапе мы исследовали сорбционную способность предложенного нами в качестве сорбента полиэтилена.

На третьем этапе изучена степень сорбции антигенов различной природы полимерным сорбентом в среде фосфатно-буферного раствора. В качестве полимерного носителя использовали полиэтилен.

Таким образом, синтетические материалы можно применять для изготовления диагностических тест-систем, позволяющих проводить реакцию агглютинации латекса для обнаружения антигенов и антител в исследуемой пробе.

По теме магистерской диссертации в научном журнале «Вестник Инновационного Евразийского университета» опубликовано две статьи «Сорбция яичного альбумина на полимерном сорбенте в различных средах», «Изучение степени сорбции антигенов различной природы полимерным сорбентом».

По результатам исследований оформляется заявка на изобретение «Способ приготовления полимерного антигенного диагностикума».

Цель, поставленная в магистерской диссертации, достигнута.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абдурахманов А. Г. Индикация специфических антигенов *Salmonella typhi* методом латексной агглютинации / А. Г. Абдурахманов, Н. Д. Ющук, Э. Г. Абдурахманова и др. // Журнал микробиол.- 1995. - №4.- С. 86-87.
2. Абраменко Т. В. Разработка метода экспресс-диагностики чумы плотоядных на основе реакции латексной агглютинации / Т. В. Абраменко, В. А. Амникин // Вопросы вирусологии.- 1999.- №1. С. 44-46.
3. Абраменко Т. В. Определение ревматоидного фактора в сыворотке крови больных методом латексной агглютинации / Т. В. Абраменко, Т. А. Мягкова // Клиническая лабораторная диагностика, 1998.- №4, С. 40-41.
4. Александер С. К. Приготовление IgG-диагностикума на основе окрашенных полиакролеиновых латексов для применения в реакции агглютинации латекса / С. К. Александер, Ю. В. Лукин, Л. М. Фидлер и др. // Журн. микробиол.- 1990.- №5-6.-С. 259-261.
5. Амфитеатрова Н. Ф. Реакция пластинчатой окрашенной латекс-микроагглютинации для выявления противокклюзных антител в слюне / Н. Ф. Амфитеатрова, А. О. Кисилев // Лабораторное дело.- 1990.- №6.- С. 61-63.
6. Анакина Ю. Г. Диагностики инфекционной бурсальной болезни кур, интернет
7. Ануфриев А. И. Чума крупного рогатого скота. Диагностика, профилактика и меры борьбы / А. И. Ануфриев, Л. А. Ануфриева, К. Е. Абелян // Ереван, Зак. филиал ВНИИИ.- 1987.- инв №794/т.- С. 156.
8. Атаев Э. К. Реакция агглютинации латекса при ящуре / Э. К. Атаев, Е. П. Баборенко // Тезисы докладов ВНИИИ.- Владимир.- 1988.- С.37.
9. Багашева С. С. Приготовление иммуноглобулиновых эритроцитарных диагностикумов на основе монорецепторных антител / С. С. Багашева, С. Е. Асанова // Вопросы вирусологии.- 1989.- №1.- С. 115-117.
10. Базиков И. А. Использование полиакролеинового латекса в получении тест-системы для экспресс-диагностики сифилиса / И. А. Базиков // Вестник дерматологии и венерологии.- 2001.- №4.- С. 40-41.
11. Банзал Р. П. Обнаружение антигена вируса чумы КРС методом латексагглютинации / Р. П. Банзал, Р. К. Йошин // Acta Virologica.-32.-1988.- №5.- С.275-277.
12. Ванаг В. К. Иммобилизация ферментов на монодисперсных латексах / В. К. Ванаг, В. Н. Бахарев // Биотехнология.- 1989.- №5-6.- С.729-734
13. Вильмс К. Иммунологические методы: пер. с нем. под ред. Г. Фремеля.-М.; Медицина.- 1987.- С.219-221.
14. Воробьева З. Г. Метод латекс агглютинации для выявления иммуноглобулинов класса М / З. Г. Воробьева, Т. В. Блинова // Клиническая лабораторная диагностика.- 2000.- №5.- С. 44-46.
15. Воробьева З. Г. Определения концентрации иммуноглобулинов с помощью реакции агглютинации латекса / З. Г. Воробьева, Т. В. Блинова // Клиническая лабораторная диагностика.- 2000.- №2.- С. 20-22.

16.Воробьева З. Г. Экспериментальные основы реакции латекс-агглютинации / З. Г. Воробьева, Е. Н. Фокина // Клиническая лабораторная диагностика.- 1992.- №7-8.- С.60-62.

17.Воробьева З. Г. Реакция агглютинации латекса / З. Г. Воробьева // Ветеринария.- 1996.- №4.- С. 26.

18.Гаврина В. Г. Справочник ветеринарного врача/ В. Г. Гаврина, И. И. Калужного // Издание 3-е, испр. и доп.- Ростов н/Д.: издательство «Феникс».- 2001.- 249-256 с.

19.Головко А. И. Реакция агглютинации в латексе для обнаружения адгезивного антигена у E.coli / А. И. Головко, Г. В. Гнатенко // Ветеринария.- 1992.- №2.- С. 24.

20.Головко А. Н. Реакция агглютинации латекса для обнаружения адгезивного антигена у кишечной палочки / А. Н. Головко, Г. В. Гнатенко , Г. А. Красников // Ветеринария.- 1990.- №2.- С.35-37.

21.Горбачев Е. Г. Иммуноферментный анализ и реакции агглютинации латекса: применение для диагностики ротавирусного гастроэнтерита / Е. Г. Горбачев, Е. Н. Вербов // Вопросы вирусологии.- 1989.-№1.- С. 109-112.

22.Демина А. А. Методы микроанализа: латексагглютинация и иммуноферментный анализ в диагностике менингококковой инфекции / А. А. Демина , И. М. Самсонов // Журн. микробиол.- 1987.- №9.- С.94-98.

23.Джавадова И. М. Реакция агглютинации латекса для диагностики инфекционного бурсита кур /И. М. Джавадова , Ф. С.Кудрявцев , Э. Д. Джавадов // Ветеринария.- 1990.- №12.- С.30-31.

24.Ерохин Е. П. Метод пассивной агглютинации полимерных дисперсий для диагностики легионеллеза /Е. П. Ерохин , И. С. Тартаковский , О. В

25.Ивановская Л. Я. Использование модифицированной реакции связывания комплемента для экспрессной диагностики вирусных инфекций / Л. Я. Ивановская // Клиническая лабораторная диагностика.- 1999.- №7.- С. 10-11.

26.Кардаш Г. И. Исследование реакции агглютинации методом светорассеяния / Г. И. Кардаш , Е. И. Ахметова , А. Л. Изюмников и др. // Лаб. дело.- 1990.- №5.- С.55-58.

27.Клисенко Г. А. Органические и неорганические сорбенты антител для приготовления арбовирусных диагностикумов: Тез. докл. 16 Всес. съезда микробиол. и иммунологов. Ч. 3. М./Г. А. Клисенко, В. Р. Обухова, Н. К. Шаноян // 1977.-С.210-211.

28.Лазовская А. Л. Диагностика чумы плотоядных / А. Л. Лазовская , З. Г. Воробьева // Ветеринария.- 1996.- №2.- С.53-54.

29.Маренникова С. С. Выявление антигена ВИЧ и антител к нему с помощью теста агглютинации с отечественным латексом / С. С. Маренникова , Ф. С. Носиков , Э. М. Шелухина // Вопросы вирусологии.- 1990.- №3.- С.245-248.

30.Марчиардо Ж. Экспресс диагностика в микробиологии. Настоящее и будущее / Ж. Марчиардо , Р. Серра // Лабораторное дело.- 1990.- №9.- С. 64-67.

31.Опалейчук И. С. Использование реакции агглютинации латекса для диагностики бруцеллезной инфекции / И. С. Опалейчук , Н. С. Умнова , М. М. Желудков // Журн. микробиол.- 1991.- №7.- С. 61-63.

32.Плотникова Э. М. Использование полистироловых латексов в качестве иммуноглобулинов для конструирования противобруцеллезных диагностикумов / Э. М. Плотникова, К. М. Салмаков // Журн. Микробиол.- №6.- С. 59-61.

33.Резников Ю. П. Латексный тест в диагностике внутриутробной инфекции / Ю. П. Резников , Ф. Р. Серина // Лаб. дело.- 1974.- №11.- С.682-684.

34.Симонова Э. Г. Вирусные болезни сельскохозяйственных животных / Э. Г. Симонова , И. В. Никишин , Г. М. Карпов - Владимир, 1995.- 17 с.

35.Сомова А. В. Оценка чувствительности и специфичности теста агглютинации частиц латекса для выявления антигена гепатита В.: Эпидемиология и профилактика вирусного гепатита /А. В. Сомова, В. А. Бурлез // Таллинн.- 1976.- С.134-135.

36.Сюрин В. Н. Ветеринарная вирусология / В. Н. Сюрин , Р. В. Белоусова , Н. В. Фомина -М.: Агропромиздат.- 1991.- 397-401 с.

37.Тест «Диарлекс»// Сетевой узел лаборатории ИНВИТРО <http://www.invitro.ru/news.htm>

38.Тыщенко Е. П. Серологическая диагностика болезни Марека / Е. П. Тыщенко , Э. Д. Джавадов // Ветеринария.- 1991.- №9.- С.33-36.

39.Тыщенко И. П. Ультроструктурный анализ компонентов реакции латексагглютинации / И. П. Тыщенко // Ветеринария.- 1992.- №7-8.- С.26-29.

40.Фикс Л. И. Разработка и апробация реакции латекс-агглютинации для экспресс-диагностики стафилококковой инфекции / Л. И. Фикс , Л. В. Иноземцева , Л. Т. Мусина и др. // Журн. микробиол.- 1995.- №6.- С. 73-74.

41.Чайка Н. А. Применение реакции агглютинации сенсibilизированного латекса для диагностики вирусных инфекций / Н. А. Чайка , Е. Г. Горбачев // Вопросы вирусологии.- 1985.- №5.- С. 111-112.

42.Чайка Н. А. Реакция агглютинации латекса.: Иммунологическая диагностика вирусных инфекций./ А. Н. Чайка, Т. В. Перадзе, П. Халонена// Медицина, 1985.- С.121-143.

43.Abbot A. D. et al. A rapid latex particle agglutination assay for the detection on herpes simplex virus antibody in human serum.// Austr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.- 1987.-№ 1-6.-p.348.

44.Al-Kijaj M.,Sthonthanal H. Latex agglutination test and HAA.// Brit. Med. J.- 1972.- v.3.-№5829.-з. 769.

45.Aria S. C. Latex agglutination test using a monoclonal antibody for rotavirus detection in stool specimens under adverse conditions.//Ann. Inst. Pasteur./ Viral.- 1988.-v. 139.- p. 305.

46.Aymard M., Quash L., Million J. Determination of antineuraminidase antibody titers in human sera by inhibition of the agglutination of feruin-latex by influenza viruses.// J. Biol. Stand.-1982.- v. 10.-№2.-p.125-133.

47. Bonacker L., Stark J. Latex- agglutination, a rapid screening method for detection of hepatitis-associated antigen.// Progress in immunological standartization.- Basel et al., 1982.- v.5.- p. 70-74.
48. Bonascer L., Sterk J. Latex- agglutination- eine schnelle Skreeningsmethod zur Nachweis des HAAs.// Klin. Wschr.- 1972.- №50.- p. 166
49. Brade H., Klein M., Schidt W. Bildung und Persistenz Latex- agglutinationschemmender Antikörper in Resusaffen nach infektion mit Cozciovirus Typ B4.// Z. Immunforsh.- 1976.- v. 151, №5.- p.461-465.
50. Carcajal C., Dibella J., Stincer M. Analisis and comparison of twu methods to detect hepaites B antigen.// Amer. J. Clin. Path.-1976.-v.65,№4.-p.547-549.
51. Debby A. H., Abbot A. A. et al. Evalution of a latex particle agglutination assay for the detection of cytomegalovirus antibody in patient serum.// J. Clin. Microbiol.-1989.-v.27,№27.-2878-2879.
52. Destimter J. Tho Latex test For Australia antigen in subjects with and without hepatitis.// Wox. Sang. Suppl.-1973.-№24.-p.88-94.
53. Grandien M. et al. Latex agglutination test for adenovirus diagnosis in diarrheal disease.// J. Med. Virol.-1987.-v.23,№4.-p.311-316.
54. Hapkins R., Das P. Latex agglutination testfor detection of Australia antigen among blood donores and patients.// J. Clin. Pathol.-1974.-v.27.-№1/-p.40-44.
55. Hewicker, Dansth S. et al. Detection of canine viral antigen in formalinfixed and parafin-embedded tissue of a fitch, using an immunoperoxidase technique.// Dtsch. Tier. Wochenschr.,1990.-97.-№2.-p.85-88.
56. Heymer B., Schemaye W. et al. A latex agglutination test fomeasuring antibodies to streptococcal mucopeptides.// J. Immunol.-1973.-v.111.-№2.-p.478-554.
57. Inrena Th. J., Iritani B. Rapid detection of group C streptocjcci from animals by latex agglutination.// J/ Clin. Microbiol.-1987.-v.27.-№2.-p.309-312.
58. Mones M. L., Klein M. et al. Der Nachweis von Immunoglobulin A mit Hilfe der latex agglutination test.// Arztl. Lab.-1979.-v.25.-p.243-246.
59. Oreskes J., Singer J. The mechanism of particulate carrier reactions.I. Adsorbtion of human gamma-globulin to polystyrene latex particles.// j. Immunol.-1961/-v/86.-№3.-p.338-343.
60. Quarsh L. A., Niveleau A. et al. Immunol latex visualisation of cell surfase Forssman and polyamine antigens.// Exp. Cell Res.-1976.-v.98.-p.253-262/
61. Quash L. A., Rocha A. et al. The preparation of latex particles with covaler ty bound polyamines, IgG and measles agglutination test.// J. Immun. Meth.-1978.-v.22.-№112.-p.165-174.
62. Reed C. A., Daly Z. A., Stroch L. A. Evalution of a agglutination test for herpes simplex virus (HSV) antigen.// Abst. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.-1986.-p.23-28.
63. Satoshi T., Tadamitsu S., Michio J. Method for assayng antigen-antibody reaction and thereof.// Pat. USA 467045.
64. Sever J., Tran N. et al. Rapid latex agglutination test for rubella antibody.// J. Clin. Microbiol, 1983.-v.17.-№1.-p.52-54.

65. Siegel H., Klein M., Schmidt W. The latex agglutination test virus and Coxsackie viruses.// Zbl. Bact. J. Abt. Orig. A.-1979.-v.245.-3.-p.271-275.
66. Torrance L. Use of protein A to improve sensitization of latex particles with antibodies to plant viruses.// Ann. appl. Biol.-1980.-v.96.-№1.-p.45-50.
67. Wild T., Quash G. et al. The use of measles latex reagent for the determination of measles antibodies and specific test for multiple sclerosis.// Med. Microbiol.-1978.-v.166.-№1/4.-p.219-226.
68. Wilms K. Latex-Test zur Bestimmung der «Hepatitis Associated Antigen» (HNA).// Folia haematol.-1973.-v.99.-p.385-389.
69. Wilms K., Bader L. et al. Zum Wertigkeit des Latex-Testes als Nachweismethode des «Hepatitis B-Antigen» bei Blutspender.// Dtsch. Ges. Wesen.-1975.-v.30.-p.2141-2143.
70. Березин И.В., Клячко Н.Л., Леващов А.В., Мартинек К., Мотаев В.В., Хмельницкий Ю.Л. – М.: Высшая школа, 1987. – 160с.
71. Тривен М. Иммуобилизованные клетки и ферменты. – М.: Мир, 1983. – 214с.
72. Вудворд Д. Иммуобилизованные клетки и ферменты. – М.: Мир, 1983. – 215с.
73. Гмурман В.Е. Руководство к решению задач по теории вероятной и математической статистике. – М.: Высшая школа, 1998. – 400с.