

**Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

КАЛАШНИКОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ
КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КОМБИНИРОВАННЫХ ВАКЦИН
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ДИФТЕРИИ, СТОЛБНЯКА И КОКЛЮША
НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Николаева А.М.

Пермь - 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Список основных сокращений	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	
КОМБИНИРОВАННЫЕ ВАКЦИННЫЕ ПРЕПАРАТЫ. МЕТОДЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИННЫХ ПРЕ- ПАРАТОВ И ИХ СТАНДАРТИЗАЦИЯ	13
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1. Материалы	34
2.1.1. Препараты и реагенты	34
2.1.2. Вакцины	35
2.1.3. Штаммы микроорганизмов	37
2.1.4. Оборудование	37
2.1.5. Животные	37
2.2. Методы	37
2.2.1. Определение белка	37
2.2.2. Реакция флокуляции (РФ)	37
2.2.3. Реакция агглютинации (РА)	37
2.2.4. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)	38
2.2.5. Реакция иммунодиффузии (РИД)	38
2.2.6. Реакция коаггутинации (РКОА)	38
2.2.7. «Тормозной» вариант РКОА	39
2.2.8. Реакция бактериосорбции иммунных комплексов (РБИК)	39
2.2.9. Аффинная хроматография	40
2.2.10. Гельхроматография	40
2.2.11. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	40
2.2.12. Иммуноферментный анализ	41
2.2.13. Лиофильное высушивание реагентов	43

2.2.14. Биологические методы с использованием животных	43
2.2.15. Статистическая обработка данных	44
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ	
ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ	
3.1. Получение гипериммунных кроличьих сывороток	45
3.2. Конструирование антигенных иммуносорбентов, отработка условий выделения аффинноочищенных антител	49
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-НАБОРА	
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИФТЕРИЙНОГО, СТОЛБНЯЧНОГО И	
КОКЛЮШНЫХ АНТИГЕНОВ В РЕАКЦИИ КОАГГЛЮТИНАЦИИ	
4.1. Отработка технологии получения стафилококкового бактериально-клеточного реагента, содержащего белок А. Отработка методов окрашивания реагента	59
4.2. Конструирование специфических диагностикумов на основе БКР: отработка условий сенсibilизации БКР кроличьими антителами, приготовление окрашенных диагностикумов для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов	69
4.3. Комплектация тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коагглютинации. Изучение стабильности тест-набора при хранении	76
4.4. Валидация тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коагглютинации	84
4.5. Изучение возможности применения РКОА в производстве вакцинных препаратов	88
ГЛАВА 5. КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ	
ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АВИДИН-БИОТИНОВОГО	
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНО-	
СТИ СУБСТАНЦИИ БЕСКЛЕТОЧНОЙ КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНЫ	
5.1. Разработка технологии получения апмплифицированных конъюгатов	108

на основе коклюшных аффинноочищенных антител кролика	109
5.2. Конструирование иммуноферментной тест-системы для оценки антигенной фракции <i>Bordetella pertussis</i> . Изучение стабильности тест-системы при хранении	111
5.3. Валидация иммуноферментной тест-системы для оценки специфической активности субстанции бесклеточной коклюшной вакцины	125
5.4. Изучение возможности применения иммуноферментной тест-системы в производстве бесклеточной коклюшной вакцины	132
ВЫВОДЫ	134
БЛАГОДАРНОСТИ	135
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	136
ПРИЛОЖЕНИЕ	159

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АД-М	вакцина для профилактики дифтерии адсорбированная жидкая
АДС-М	вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная жидкая
аАКДС	вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая с ацеллюлярным коклюшным компонентом
аАКДС-Геп В+Ніb	вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип <i>b</i> , конъюгированная синтетическая
АКДС	вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая
АКДС-Геп В	вакцина для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая
АКДС-Геп В+Ніb	вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип <i>b</i> , конъюгированная синтетическая
АС-анатоксин	вакцина для профилактики столбняка адсорбированная жидкая
ВКВ	внутрипостановочный коэффициент вариации
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ИФА	иммуноферментный анализ
ИФТС	иммуноферментная тест-система
К ⁻	отрицательный контрольный образец
К ⁺	положительный контрольный образец
КББ	карбонатно-бикарбонатный буферный раствор (рН 8,6)
МЕ	международные единицы

МКВ	межпостановочный коэффициент вариации
МИБП	медицинские иммунобиологические препараты
ОКДА	анатоксин дифтерийный очищенный концентрированный
ОКСА	анатоксин столбнячный очищенный концентрированный
ОП	оптическая плотность
РА	реакция агглютинации
РБИК	реакция бактериосорбции иммунных комплексов
РНГА	реакция непрямой гемагглютинации
РКОА	реакция коагглютинации
ТМБ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
ФСБ	фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2-7,4)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Контроль и управление инфекциями в современном мире продолжает оставаться серьезной проблемой. Предотвращение распространения инфекций с помощью иммунизации, без сомнения, является одним из величайших достижений человечества в области медицины. Массовая вакцинация населения – самый действенный, доступный и экономически эффективный инструмент борьбы с инфекционными заболеваниями [44, 95, 105].

Производство вакцин является сложным и длительным процессом, требующим четкого осуществления многообразных технологических стадий. Качество вакцинных препаратов характеризуется главным образом их безопасностью и эффективностью, о которых судят по ряду показателей, определяемых физико-химическими, микробиологическими, иммунологическими, клиническими методами [19].

Согласно правилам GMP, при производстве вакцинных препаратов необходимо постоянное слежение за специфическим продуктом. От обеспечения процесса производства таким контролем во многом может зависеть качество и стандартность выпускаемых препаратов, поэтому расширение возможностей иммуноспецифической детекции бактериальных антигенов является весьма актуальным. Совершенствование технологий производства и расширение спектра применяемых вакцин также ставит задачу разработки и внедрения новых методов контроля и стандартизации вакцинных препаратов [61].

Важным моментом становится гармонизация методов контроля отечественных вакцин с требованиями международных нормативных документов. К одним из главных показателей качества вакцинных препаратов относятся подлинность и специфическая активность. В настоящее время в нормативных документах на отечественные комбинированные вакцины показатели «Подлинность» и «Специфическая активность» трактуются однозначно и определяются по иммуногенной активности в тестах «in vivo». В Европейской Фармакопее для контроля «Подлинности» вакцинных препаратов рекомендуется использовать тесты «in vitro» [134] после десорбции компонентов: реакция флокуляции, методы на основе пре-

ципитации, иммуноферментный анализа (ИФА). Следует отметить, что тесты «in vivo» дорогостоящие, трудоемкие и продолжительны по времени. Преципитационные методы (радиальная иммунодиффузия, встречный иммуноэлектрофорез, двойная иммунодиффузия) также требуют значительного времени как на подготовительные работы, так и на осуществление самого анализа.

Серологический анализ, с помощью которого осуществляется специфическая детекция антигенов, широко используется в лабораторной диагностике и в научных исследованиях (экспериментальной иммунологии). Вместе с тем, в производстве вакцинных препаратов набор применяемых серологических методов очень ограничен. Традиционно используется реакция флуклюляции при получении ряда анатоксинных компонентов вакцин и реакция агглютинации для оценки коклюшного компонента, при этом для бесклеточной коклюшной вакцины до сих пор нет единого утвержденного метода контроля.

Таким образом, для обеспечения качества выпускаемых отечественных вакцинных препаратов необходимо совершенствование их стандартизации и контроля на основе международных требований, применяя методы «in vitro», но более простые, недорогие и экспрессные. Таким критериям отвечают реакция коаггутинации (РКОА) и ИФА.

Цель работы – экспериментально обосновать и разработать технологию получения тест-систем для контроля качества вакцинных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша на основе РКОА и ИФА.

Задачи исследования

1. Разработать технологию получения антительных реагентов для конструирования тест-систем.
2. Сконструировать оптимальные композиции тест-систем на основе РКОА и ИФА.
3. Оценить качество разработанных тест-систем по основным валидационным критериям.

4. Определить область применения разработанных тест-систем в системе контроля качества препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша.

Научная новизна

1. Экспериментально обоснована и разработана оригинальная конструкция тест-системы для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА «ТН-ДСК-КОА» с окрашенными коаггутинационными диагностикумами, отвечающей по своим валидационным характеристикам требованиям действующих нормативных документов.

2. Впервые показана возможность применения для оценки подлинности и полноты сорбции дифтерийного, столбнячного и коклюшного компонентов комбинированных вакцин и экспрессного слежения за целевым продуктом в условиях производства БКВ и столбнячного анатоксина метода «in vitro» - РКОА с использованием разработанной тест-системы «ТН-ДСК-КОА».

3. Экспериментально обоснована и разработана оригинальная конструкция иммуноферментной тест-системы (ИФТС) для определения специфической активности субстанции БКВ «ИФА КАГ» на основе амплифицирующей системы авидин-биотин. Впервые аттестован отечественный стандарт субстанции БКВ. Разработана методика количественного определения содержания антигенной фракции *Bordetella pertussis* в сравнении с разработанным референс-препаратом специфической активности субстанции БКВ.

Практическая значимость работы и внедрение результатов исследования

1. Разработана технология изготовления Тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА («ТН-ДСК-КОА»). Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство тест-системы «ТН-ДСК-КОА» (инструкция по применению (утв.

29.05.2012), технические условия 9388-164-14237183-2012, промышленный регламент № 04862997-84-12).

2. По результатам испытания набора «ТН-ДСК-КОА» в ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России сделано заключение, что метод РКОА с использованием разработанной тест-системы пригоден для определения подлинности и полноты сорбции дифтерийного, столбнячного и коклюшного (цельноклеточного и бесклеточного) компонентов вакцинных препаратов. Метод контроля вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша по показателям «Подлинность» и «Полнота сорбции» с применением набора «ТН-ДСК-КОА» в РКОА включен в проекты ФСП "Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина АКДС-Геп В+Hib)" и "Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина аАКДС-Геп В+Hib)".

3. Разработана технология изготовления ИФТС для определения специфической активности субстанции БКВ «ИФА КАГ». Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство тест-системы «ИФА КАГ» (инструкция по применению (утв. 20.11.2013), технические условия 9388-167-14237183-2013, проект опытно-промышленного регламента).

4. Метод контроля субстанции БКВ по показателю «Специфическая активность» с использованием разработанной ИФТС включен в проект ФСП "Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная, субстанция".

Положения, выносимые на защиту

1. Технология получения Тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА «ТН-ДСК-КОА». Валидация разработанной тест-системы.

2. Использование «ТН-ДСК-КОА» в системе контроля качества вакцинных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша.

3. Технология получения Тест-системы иммуноферментной для определения специфической активности вакцины коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции «ИФА КАГ». Валидация разработанной тест-системы.

4. Использование «ИФА КАГ» в системе контроля качества коклюшного компонента вакцинных препаратов.

Апробация работы. Результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (г. Москва, 2010); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Курского государственного медицинского университета (г. Курск, 2010); Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию ПГФА «Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов – от разработки до коммерциализации» (г. Пермь, 2011); X съезде ВНПОЭМП «Инфекция и иммунитет» (г. Москва, 2012).

Личное участие автора в получении научных результатов. Данные, приведенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора на всех этапах планирования и проведения экспериментальных исследований, статистической обработки полученных результатов, внедрения их в производство и написании публикаций.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Исследования выполнены в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, номер государственной регистрации 01.9.50 007426.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 –

технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2, 7 паспорта специальности – технология получения лекарств.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (главы 2-5), выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 185 страницах машинописного текста (из них 26 страниц приложения), содержит 16 рисунков, 42 таблицы. Указатель литературы состоит из 200 источников, из них 101 на иностранных языках.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

КОМБИНИРОВАННЫЕ ВАКЦИННЫЕ ПРЕПАРАТЫ. МЕТОДЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Предотвращение распространения инфекций с помощью иммунизации является одним из величайших достижений человечества в области медицины. Эффективность иммунопрофилактики наглядно продемонстрирована десятками лет ее практического применения. Длительное время целью массовых прививок было снижение заболеваемости детскими инфекциями и смертности от них. В настоящее время главной задачей вакцинопрофилактики является поддержание достигнутого эпидемического благополучия [52, 95, 186].

Обширный охват вакцинацией населения практически во всем мире позволил снизить заболеваемость коклюшем, столбняком, дифтерией, корью, паротитом, инфекцией, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, до 99,9 % по сравнению с довакцинальным периодом, практически искоренен полиомиелит, ликвидирована оспа [24, 44, 52, 144, 187].

Последние десятилетия многие государства осуществляют научные и производственные программы, связанные с защитой от особо опасных бактериальных и вирусных инфекций. Постоянно ведутся исследования по созданию новых, более безопасных и иммуногенных вакцинных препаратов, разрабатываются новые способы введения вакцин (назальные спреи, эмульсии и т.д.) [44, 158, 178]. Важным направлением исследований по совершенствованию вакцинных препаратов является поиск новых перспективных адъювантов. Это связано с постоянной необходимостью усиливать иммунный ответ на обширное количество новых антигенов, для большинства которых характерна слабая иммуногенность [13, 169, 173, 196]. Наиболее распространенный, хотя и не универсальный, адъювант для вакцин – алюминия гидроксид [24, 117]. Активно изучается возможность использования новых безопасных и имеющих более

сильные иммуностимулирующие свойства адъювантов, в качестве которых рассматриваются цитокины [17, 49, 56, 60], наночастицы: липосомы, иммуностимулирующие комплексы, эмульсии (MF59, SAF, Монтанид), полимерные наносферы, вирусоподобные частицы и др. [14, 47, 50, 106, 107, 129].

Ведутся исследования по созданию вакцин для профилактики и лечения некоторых гинекологических состояний, аутоиммунных болезней и различных видов аллергии [70]. Одним из перспективных направлений, связанных с развитием генетики и биоинформатики, является разработка вакцин, содержащих нужные антигены и различные цитокины, которые являются естественными регуляторами иммунного ответа. Такие вакцины могут быть получены не только путем простого соединения компонентов, но и с помощью генной инженерии (живые векторные вакцины, рекомбинантные, растительные вакцины и пр.) [112, 143, 152, 195].

В настоящее время имеет место тенденция расширения списка профилактических прививок, предполагается, что в первой половине наступившего века календарь профилактических прививок будет включать иммунизацию против 35-40 заболеваний [57, 72]. Проведение большого числа инъекций является не только крайне нежелательным, но и фактически невозможным. Поэтому наиболее реальным выходом из сложившейся ситуации представляется максимально широкое использование различных комбинаций вакцинных препаратов. Еще при принятии в 1990 г. второго варианта Расширенной программы иммунизации, ВОЗ были сформулированы требования, предъявляемые к идеальной вакцине. Это должен быть препарат, содержащий все доступные компоненты в одной дозе, желателно вводимой перорально, температурно-резистентный, эффективный в ближайшее время после рождения и доступный для семей с разным материальным достатком. Естественно, что создание подобной вакцины – дело достаточно отдаленного будущего.

На данный момент в практике здравоохранения имеется два десятка комбинированных вакцин. Их можно разделить на две группы. Комбинированные вакцины первой группы содержат антигены вакцинных штаммов разных

возбудителей, вакцины второй группы состоят из антигенов разных серотипов одного и того же возбудителя. К первой группе комбинированных вакцин относятся АКДС-вакцина, дивакцина (корь, паротит), тривакцина (корь, паротит, краснуха), вакцина против гепатитов А и В и более сложные вакцины (АКДС-вакцина+инактивированная вакцина против полиомиелита, АКДС-вакцина+вакцина против гепатита В и др.). Вторую группу комбинированных вакцин составляют трехвалентная полиомиелитная вакцина, менингококковые вакцины из 2—4 серотипов менингококка, пневмококковая вакцина из 23 серотипов пневмококка, комплексные вакцины из условно патогенных микроорганизмов и пр. [177].

Таким образом, на настоящий момент АКДС-вакцина является основной комбинированной вакциной, базисом, платформой для включения новых антигенов (вакцины против гепатита В, полиомиелита, Hib-вакцины и т.д.).

Первые комбинации, включавшие в себя дифтерийный и столбнячный анатоксины, были получены в конце 30-х годов XX столетия после того, как была показана сравнительно низкая иммуногенность монопрепарата столбнячного анатоксина. В дальнейшем была установлена возможность включения в этот препарат коклюшной вакцины, обладающей выраженными адъювантирующими свойствами, что значительно улучшило иммуногенную активность обоих анатоксинов по сравнению с использованием монопрепаратов. Адсорбция анатоксинов алюмосодержащими препаратами также способствовала повышению их иммуногенности при одновременном снижении токсичности коклюшного компонента.

В нашей стране АКДС-вакцина начала использоваться с 1960 г и уже к 1965 г практически полностью вытеснила ранее применявшиеся монопрепараты [52]. В некоторых странах аналогичная комбинированная вакцина нашла свое применение еще раньше, например, в США – в 1948 г. Состав этих препаратов может значительно отличаться в зависимости как от страны изготовления, так и от конкретного изготовителя [177]. В России используется комбинация, содержащая 30 Lf (флокулирующих единиц) дифтерийного анатоксина, 10 Lf

столбнячного анатоксина и 20 МЕ (международных единиц) коклюшной суспензии [52].

Первая коклюшная вакцина, разработанная более 70 лет назад, была цельноклеточной, то есть представляла собой суспензию убитых клеток *Bordetella pertussis*. Впервые она появилась на рынке США в 1941 г., а в течение 40-50-х гг. прошлого столетия в развитых странах мира была введена всеобщая вакцинация против коклюша, позволившая значительно снизить заболеваемость и смертность [190].

Обратной стороной медали при проведении вакцинации комбинированными коклюшно-дифтерийно-столбнячными вакцинами с цельноклеточным коклюшным компонентом (АКДС) оказалась достаточно высокая частота поствакцинальных реакций и осложнений [87, 193].

Именно в силу потенциальной опасности неврологических осложнений в некоторых странах Западной Европы, а также в Японии в 1970 г было принято решение значительно сократить применение цельноклеточной вакцины против коклюша [41, 87, 175]. Исследования Gangarosa et al. показали причинно-следственную связь между кампанией против вакцинации и последующей эпидемией коклюша в странах, где охват прививками сократился [198]. Так, например, после отмены вакцинации произошли эпидемии коклюша в Великобритании в 1970-80 гг. и в Швеции в 1979-1996 гг. Вследствие этого стала очевидной необходимость возобновления иммунопрофилактики [190]. Однако высокая реактогенность существовавшей вакцины побудила ученых продолжать научные изыскания, направленные на создание следующего, более безопасного поколения комбинированных коклюшно-дифтерийно-столбнячных вакцин.

Первые бесклеточные коклюшные вакцины (БКВ) были моновалентными и содержали лишь один компонент – коклюшный токсин, который, как известно, является ведущим протективным антигеном *B. pertussis*, обеспечивающим формирование длительного и напряженного иммунитета [127]. Однако вопреки первоначальным надеждам, разработка вакцин на основе обезвреженного токсина, продуцируемого *B. pertussis*, или на основе другого антигенного компонента воз-

будителя не увенчалась успехом ввиду их низкой эффективности. Следующим логичным этапом стало создание бесклеточных (ацеллюлярных) вакцин нового поколения на основе нескольких антигенов (от 2 до 5) коклюшной палочки, характеризующихся наиболее высокой иммуногенностью, исключив при этом опасные токсичные компоненты *B. pertussis* (трахеальный цитотоксин, дермонекротический токсин, аденилатциклазу, эндотоксины) [104, 113, 115, 116, 139, 153, 166]. Было установлено, что ведущими протективными антигенами *B. pertussis* являются коклюшный токсин (PT), филаментозный гемагглютинин (FHA), пертактин (PRN), фимбрии или агглютиногены (Fim) [18, 118, 132, 155].

Первая такая вакцина лицензирована и включена в календарь прививок в составе дифтерийно-столбнячно-коклюшной вакцины в Японии в 1981 г. [190]. В последующем в Европе и США было создано более 20 подобных препаратов, отличающихся по составу антигенов, методам очистки, методу инактивации токсина, адьювантам [164]. Некоторые из них в виде монопрепарата или компонента комбинированных вакцин стали коммерческими, зарегистрированы и применяются на практике во многих странах. В настоящее время бесклеточная коклюшная вакцина в составе комбинированного препарата включена в календарь прививок в США, Канаде, Германии, Норвегии, Швеции, Италии, Дании, Ирландии, частично – в Австралии, Словении, Китае, Латвии, Литве [146]. Причем в ряде стран, например, в США, национальные календари прививок предусматривают проведение иммунизации против коклюша только с использованием ацеллюлярной вакцины.

Однако по результатам многоцентровых исследований установлено, что самые эффективные бесклеточные коклюшные вакцины уступают высокоэффективным цельноклеточным (профилактическая эффективность 74 - 93 и 92 - 98% соответственно). Это объясняют формированием определенного типа иммунитета, который стимулируется этими вакцинами, а именно продукцией высокого уровня специфических антител, то есть формированием гуморального иммунитета, или ответа по типу Th2. Цельноклеточные вакцины стимулируют выработку клеточного иммунитета, или ответа по типу Th1 [97, 128, 130]. В то же время было выявлено, что если основной курс вакцинации был проведен

цельноклеточной вакциной, а для ревакцинации детей в возрасте 15 - 20 месяцев и 4 - 6 лет использовали бесклеточную коклюшную вакцину, то у детей формировались оба типа иммунного ответа, по сравнению с ответом, формирующимся после использования только цельноклеточных или бесклеточных вакцин [200]. Таким образом, формированию более полноценного (как клеточного, так и гуморального) противокклюшного иммунитета способствует использование в системе национального здравоохранения комбинированных вакцин в сочетании с ЦКВ и БКВ. Так, экспертами ВОЗ высказано мнение о целесообразности применения комбинированных препаратов, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент, лишь для первичной иммунизации с целью создания базисного иммунитета, а ревакцинацию в 6-7 лет проводить бесклеточной коклюшной вакциной оптимального состава [199]. Кроме того, комбинированные вакцинные препараты с ацеллюлярным коклюшным компонентом согласно предложению ВОЗ рекомендуется использовать для бустерной вакцинации подростков и взрослых [170, 174, 199].

Методы специфической оценки компонентов вакцинных препаратов и их стандартизация

Контроль качества, эффективности и безопасности лекарственных средств является одной из приоритетных задач в системе здравоохранения России в настоящее время. Для реализации этого направления создана система государственного контроля качества, позволяющая своевременно выявлять и изымать из обращения недоброкачественную и фальсифицированную продукцию, тем самым обеспечивая население эффективными и безопасными лекарствами [54, 55].

Основными направлениями работы системы контроля качества являются: оценка качества, эффективности и безопасности лекарственных средств в процессе государственной регистрации (на опытно-промышленных и промышленных образцах); экспертиза качества (проводится выборочно); мониторинг эффективности и безопасности лекарственных средств, находящихся в обращении; инспекционный контроль.

Вакцины отличаются от других иммунобиологических препаратов (МИБП) сложностью состава, технологией изготовления, разнообразием механизмов действия на организм и необходимостью особого контроля за их безопасностью [25, 30].

Существующая в Российской Федерации система надзора за качеством вакцин основана на принципах его гарантий, обеспечивающихся не только за счет контроля конечной продукции, но, прежде всего, созданием условий, гарантирующих выпуск безопасных вакцин [10, 11, 79].

В современных условиях требования к качеству иммунобиологических препаратов регламентируются международными правилами на всех этапах их производства и испытаний: это правила GLP (Good Laboratory Practice), GCP (Good Clinical Practice) и GMP (Good Manufacturing Practice).

GMP - «Правила надлежащего производства лекарственных средств» - направлены на обеспечение необходимого уровня безопасности лекарственных средств и гарантирование того, что лекарственное средство изготовлено в соответствии с нормативной документацией, маркировано надлежащим образом, упаковано и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

В России с целью организации производства и контроля согласно международным требованиям в 2009 г утвержден ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля лекарственных средств» [7], а в 2013 г утверждены приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 4.06.2013 N 916 «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств» [11], положения которых гармонизированы с Руководством GMP, принятым в Европейском союзе. Согласно данным документам, производство медицинских иммунобиологических препаратов требует постоянного оперативного слежения за целевым продуктом и контроля его специфических свойств на всех технологических стадиях производства.

Так, производственный процесс изготовления токсинов-анатоксинов, входящих в состав АКДС-вакцины, включает целый ряд самостоятельных этапов, связанных с получением исходного целевого продукта (токсина), физико-

химической переработкой его (детоксикацией формальдегидом), очисткой и концентрацией активного начала (антигена) с использованием солевого и кислотного осаждения, а также методов ультрафильтрации и хроматографии. Важным параметром является максимальное сохранение специфических свойств токсина-анатоксина, которые практически не могут быть учтены в динамике при текущем производстве препарата.

При существующей в настоящее время практике антигенные свойства дифтерийных токсинов-анатоксинов определяют в реакции флокуляции, основным же способом оценки столбнячных токсинов-анатоксинов является биологический метод на белых мышах.

Согласно нормативным документам на отечественные вакцины при оценке готового препарата по показателю "Подлинность" используют биологические тесты на животных по оценке специфической активности. Так, подлинность и специфическую активность дифтерийного компонента оценивают в тесте заражения на морских свинках, столбнячного компонента - в тесте на белых беспородных мышах, коклюшного компонента - в тесте Кендрика на мышах-гибридах F1 (C57BL/6JxCBA). Однако Европейская Фармакопея рекомендует для контроля подлинности применять тесты "in vitro" после десорбции компонентов. Это важно не только по чисто этическим соображениям, но научно и практически обосновано: животные дорогостоящие и не могут быть стандартизованы [142].

В связи с этим актуальным является разработка простых экспрессных методов микроанализа для контроля комбинированных вакцин, позволяющих следить за целевым продуктом в процессе производства анатоксинных препаратов, а также проводить оценку подлинности "in vitro".

Современная тенденция замены цельноклеточного коклюшного компонента в составе АКДС-вакцины на растворимый ацеллюлярный антиген ставит задачу выработки согласованных критериев оценки эффективности БКВ. С целью решения данной проблемы в 1991 г. ВОЗ создала рабочую группу экспертов, которая сформулировала общие требования к испытываемым коклюшным вакцинам: все они должны содержать инактивированный коклюшный токсин, индивидуальные ан-

тигены коклюшного микроба должны находиться в очищенном виде, антигены должны обладать протективными свойствами на лабораторных моделях [98].

В связи с тем, что ВОЗ не предъявляет строгих требований к компонентному составу БКВ (единственное условие – наличие инактивированного коклюшного токсина), все многообразие разработанных ацеллюлярных вакцин значительно различается по содержанию входящих в их состав антигенов *B. pertussis*, методам их очистки и обезвреживания (табл. 1) [85, 177]. Значительно отличаются ацеллюлярные коклюшные вакцины и по способу их получения: разные антигены могут быть выделены отдельно друг от друга и дозированно сведены в вакцину, либо возможно получение комплексной антигенной фракции, очищенной без разделения компонентов [134, 177].

Так, Н. С. Захаровой с соавторами предложен способ получения бесклеточной коклюшной вакцины из супернатанта культуры *B. pertussis*, выращенной на специально разработанной питательной среде с различными добавками, стимулирующими накопление антигенных субстанций, ответственных за формирование специфического иммунитета в организме (коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин, и др.) с последующей их детоксикацией [64]. В журнале *Current microbiology* [184] Hozbor D. e.a. изложен способ получения протективного коклюшного антигена из везикул наружной мембраны бактериальной клетки *B. pertussis* методом многоступенчатой хроматографии. Higashi H.G. с соавторами [103] предлагают для этой цели использовать высокоскоростные вакуумно-рефрижираторные ультрацентрифуги для получения протективного антигена из супернатанта бактериальной массы *B. pertussis* с последующей его детоксикацией.

Вакцинные препараты с бесклеточным коклюшным компонентом

Страна и фирма-производитель вакцины	Название вакцины	Коклюшные антигены, мкг/доза				Дифтерийный анатоксин, Lf/доза	Столбнячный анатоксин, Lf/доза
		РТ*	FHA*	PRN*	Fim*		
США, Chiron Vaccines	Acelluvax	5	2,5	2,5	-	25	10
Канада, Sanofi Pasteur	Adacel	2,5	5	3	5	2	5
США, Wyeth Pharmaceuticals	Acel- immune	3,5	3,5	2	0,8	9	5
Италия, Biocine Sclavo	BSc-1	10	-	-	-	15	10
Бельгия, GlaxoSmithKline	Boostrix	8	8	2,5	-	2,5	5
США, Baxter Laboratories	Certiva	40	-	-	-	15	6
Канада, Connaught Laboratories	CLL-3F2	10	5	-	5	15	5
Канада, Connaught Laboratories	CLL-4F2	10	5	3	5	15	5
Канада, Sanofi Pasteur	Daptacel (Tripacel)	10	5	3	5	15	5
Канада, Sanofi Pasteur	HCPDT	20	20	3	5	15	5
Бельгия, GlaxoSmithKline	Infanrix	25	25	8	-	25	10
США, Wyeth Lederle	LPB-3P	10	20	5	-	10	5

Vaccines and Pediatrics							
США, Michigan Department of Public Health	Mich-2	25	25	-	-	15	15
Франция, Sanofi Pasteur	Pentaxim	25	25	-	-	30	10
Великобритания, Speywood (Porton) Pharmaceuticals	Por-3F2	10	10	-	10	29	5
Бельгия, SmithKline Beecham Biologicals	SKB-2	25	25	-	-	25	6
США, Massachusetts Public Health Biologic Labs	SSVI-1	50	-	-	-	10	5
Франция, Sanofi Pasteur	Tetraxim	25	25	-	-	30	10
Франция, Pasteur Merieux	Triavax	25	25	-	-	15	5
США, Aventis Pasteur	Tripedia	23,4	23,4	-	-	6,7	10

Примечание: * PT - коклюшный токсин, FHA – филаментозный гемагглютинин, PRN – пертактин, Fim – агглютиногены 1,2,3.

Разнообразие бесклеточных коклюшных вакцин по антигенному составу обусловлено и отсутствием единого мнения по отбору и количественному содержанию очищенных антигенов и критериям оценки защитной активности БКВ в лабораторных тестах. Это в значительной степени затрудняет получение вакцины с оптимальным количественным составом очищенных антигенов [98].

Несмотря на то, что многие развитые страны используют в календарях профилактических прививок комбинированные вакцинные препараты с ацеллюлярным

коклюшным компонентом вот уже на протяжении 10 и более лет, до сих пор на международном уровне не утверждены единые методы контроля, в частности для определения количественного содержания антигенов, позволяющие оценивать и стандартизировать весь процесс производства бесклеточного коклюшного компонента вплоть до его включения в состав комбинированного вакцинного препарата. Иммуногенную активность адсорбированных бесклеточных коклюшных препаратов оценивают методом ИФА по титру соответствующих антител у иммунизированных животных [85, 134], однако для несорбированных коклюшных антигенов, в том числе готовой субстанции ацеллюлярной коклюшной вакцины, данный метод неприемлем. При производстве цельноклеточного коклюшного компонента регламентированным методом оценки специфической активности «ин витро» является классическая реакция агглютинации с контрольной (диагностической) сывороткой. Визуализация результатов такой реакции обеспечивается присутствием в реакционной смеси микробных клеток, за счет которых формируются агглютинаты. Для оценки же бесклеточной вакцины применение реакции агглютинации с диагностической сывороткой невозможно. Поэтому разработка экспрессного метода «ин витро» в данном случае представляется целесообразной.

Кроме того, при наличии международного стандарта иммуногенности адсорбированной бесклеточной коклюшной вакцины JN1H-3 (NIBSC code:JN1H-3) производства *Biken Kanonji Institute, Japan*, в настоящее время нет международного стандарта субстанции бесклеточной коклюшной вакцины, одобренного Всемирной Организацией Здравоохранения.

В связи с этим каждый производитель разрабатывает свои оригинальные методики для оценки специфической активности коклюшных антигенов, слежения за целевым продуктом на стадиях производства, а также так называемые «in-house» стандартные образцы субстанции бесклеточной коклюшной вакцины.

На данный момент в нашей стране активно ведутся исследования по созданию отечественных бесклеточных коклюшных вакцин [69, 73, 98]. На базе Пермского НПО «Биомед» разрабатывается бесклеточная коклюшная вакцина и проводятся испытания по включению ее в состав комбинированных вакцинных препаратов [69,

94]. В связи с этим возникает необходимость разработки методов определения коклюшных антигенов и оценки возможности включения их в нормативную документацию на БКВ.

Серологические методы контроля вакцинных препаратов

Серологический анализ, с помощью которого осуществляется специфическая детекция антигенов и антител, широко используется в экспериментальной иммунобиологии, иммунодиагностике и в биотехнологии.

В лабораторной практике для анализа антигенов применяют серологические реакции, основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (агглютинация, преципитация) и опосредованные реакции (реакция непрямой гемагглютинации, реакция связывания комплемента), а также реакции с использованием меченых антител или антигенов (иммуноферментный, радиоиммунный анализ, метод флуоресцирующих антител). Внешнее проявление результатов серологических реакций зависит от условий ее постановки и физиологического состояния антигена. Так, корпускулярные антигены дают феномен агглютинации, иммобилизации, растворимые антигены - феномен преципитации, нейтрализации, флокуляции.

Для постановки реакций используют диагностические иммунные антисыворотки, полученные путем многократной иммунизации лабораторных животных известным антигеном, либо очищенные антитела. Сыворотка крови таких лабораторных животных содержит десятки типов поликлональных (т.е. связывающихся с различными участками антигена) антиген-специфичных антител с различной степенью аффинности, преимущественно относящихся к иммуноглобулинам класса G [76, 171]. Благодаря способности антител к обратимому связыванию и возможности получать антитела, специфичные практически к любому известному антигену, они являются основным инструментом при разработке тест-систем для серологического анализа. В связи с этим задача получения антительных препаратов как этапа разработки серологических методов оценки антигенов является актуальной.

Для выделения антител из иммунных сывороток широко используется аффинная хроматография, которая позволяет разделять сложные смеси на основе специфического взаимодействия белка с его лигандом (в данном случае с антигеном, иммобилизованным на сорбенте за счет взаимодействия его amino-, карбоксильных или тиольных групп с активированными группами сорбента) [159]. При этом неспецифические компоненты смеси, прочно не связавшиеся с лигандом сорбента, удаляют промывкой буферным раствором, а антитела элюируют кислыми (рН менее 2.5) или щелочными (рН более 10) хаотропами [148, 150]. Полученные таким образом специфические аффинноочищенные антитела служат основой для конструирования реагентов, используемых в серологических реакциях для выявления антигенов.

В производстве медицинских иммунобиологических препаратов до сих пор набор применяемых серологических методов очень ограничен. Так, как уже было сказано, для определения антигенных свойств дифтерийных, столбнячных токсинов-анатоксинов традиционно используется реакция флуклюляции. При производстве цельноклеточной коклюшной вакцины регламентированным методом оценки специфической активности «ин витро» является классическая реакция агглютинации с контрольной (диагностической) сывороткой, однако следует подчеркнуть, что данный метод неприменим для контроля бесклеточного коклюшного компонента.

В связи с этим задача расширения используемых методов контроля МИБП является весьма актуальной. Эти методы должны быть экспрессными и легко выполняемыми в условиях реального производства препаратов, по чувствительности и специфичности должны в полной мере отвечать высоким требованиям современного иммуноанализа.

К одним из наиболее экспрессных методов иммуноанализа относится *реакция коагглютинации (РКОА)*. Принцип работы коагглютинационных диагностикумов основан на иммунохимической реакции между антителами, связанными с носителем, представляющим собой фиксированные клетки *Staphylococcus aureus* (штамм Cowan 1), которые выполняют исключительно индикаторную функцию, и антигена-

ми с образованием комплекса антиген-антитело. Формирование таких комплексов в виде агглютинатов и позволяет проводить учет реакции невооруженным глазом.

С РКОА по своему механизму сходна реакция латекс-агглютинации (РЛА), где в качестве носителя выступают частицы латекса – полимерные шарообразные частицы, более или менее гомогенные по размеру (обычно диаметром 0,8-1,0 мкм). В настоящее время диагностические препараты, созданные на основе полимерных носителей, находят широкое применение в диагностике различных заболеваний с целью обнаружения малого количества антител или антигенов в различных субстратах. В ряде стран осуществляется коммерческий выпуск латексных диагностикумов. Известны диагностические препараты, созданные на основе инертных полимерных носителей для индикации в РЛА возбудителей кандидоза [138], ротавирусной [140, 168], пневмококковой [151], стафилококковой [136], хеликобактерийной инфекций [20, 137], детекции антигенов *Bacillus anthracis* [179], *Clostridium perfringens* [165], *Leptospira canicola*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. [22, 68] и др. Латексные диагностикумы применяются некоторыми производителями и для контроля вакцинных препаратов. Так, в реакции латексной агглютинации оценивается подлинность белка-носителя (столбнячного анатоксина) в Hib-вакцине (АО «ЭберБиотек», Куба). Для определения дифтерийного токсина предложен диагностикум на основе окрашенного полимерного сферического носителя, сенсibiliзировавшего антитоксическим противодифтерийным иммуноглобулином [67]. Однако, варианты диагностических тест-систем, созданных на основе полимерных носителей, сенсibiliзировавших антителами, используются достаточно редко из-за трудности иммобилизации иммуноглобулинов на поверхности носителей.

В РКОА, в отличие от других аналогичных агглютинационных методов, где в качестве носителя могут выступать латексные частицы, эритроциты и т.д., стафилококковый реагент посредством видоспецифического белка А выборочно связывается с Fc-фрагментами иммуноглобулинов, при этом Fав-фрагменты молекулы антитела остаются свободными (открытыми), приобретая пространственную ориентацию, благоприятную для связывания гомологичного антигена. Вследствие такой пространственно ориентированной фиксации антител получают препарат с высокой ре-

акционной активностью, хотя поверхность стафилококка вмещает всего 50-60 тыс. молекул IgG (эритроцит - более 1 млн.). Таким образом, взаимодействие поверхностного белка А стафилококка с сывороточными иммуноглобулинами, не являясь истинной реакцией антиген-антитело, представляет собой неспецифический феномен [141, 157, 172].

Исследователи отмечают, что Fc-фрагменты IgG, связывающиеся с белком А, присутствуют в сыворотке крови 65 видов млекопитающих и 18 видов других позвоночных животных. Содержание активных Fc-фрагментов у разных животных различное. Так, высоким аффинитетом обладают Fc-фрагменты иммуноглобулинов человека, кролика, морской свинки. С белком А реагируют 3 из 4 субклассов IgG человека [15, 102].

Сама реакция «стафилококковый реагент» + антиген протекает в течение нескольких минут, что делает РКОА наиболее экспрессной из серологических методов.

Следует особо подчеркнуть, что РКОА – это реакция с иммобилизованными антителами и, следовательно, в отличие от известного аналога – реакции микроагглютинации, позволяет исследовать антигены не только корпускулярные, но и растворимые. Реакция проста в постановке, доступна, не требует аппаратного оформления и специальной подготовки персонала. РКОА выгодно отличается от других методов иммуноанализа по экспрессности, экономичности и простоте [84].

Согласно данным литературы, РКОА широко используется для идентификации большой группы микроорганизмов, в частности, легионелл [43], хеликобактеров [28, 65], пневмококков [160], кишечной палочки [89], сальмонелл [101, 182], бактерий рода *Haemophilus spp.* [123, 167], возбудителей газовой гангрены [149], клещевого энцефалита [66], кампилобактериоза [119, 182], холеры [147, 180], коклюша [33, 62, 82], брюшного тифа [114, 163] и других антигенов инфекционной и неинфекционной природы [122, 181, 183, 185, 191]. Выпускаются коммерческие наборы для определения стрептококков, сальмонелл, пневмококков, гемофильной палочки, менингококков и ряда возбудителей других инфекций.

В Пермском НПО «Биомед» накоплен большой опыт работы по

использованию РКОА применительно к определению ряда антигенов. Одними из первых были исследования Л.И. Райхера по индикации с помощью РКОА растворимых антигенов риккетсий Провачека, Музера, Сибирика [74]. Показана высокая специфичность и воспроизводимость теста. Впервые разработаны методы определения растворимых бактериальных антигенов в РКОА на примере дифтерийного, гангренозных (перфрингенс, эдематигенс), ботулинических (тип А, В, Е) токсинов-анатоксинов, сконструированы тест - наборы для определения скрытой крови с помощью РКОА, для диагностики кампилобактериоза, гонококковой инфекции [71, 75, 83, 99]. Была продемонстрирована перспективность применения РКОА в производстве гангренозных анатоксинов [84]. Вместе с тем для использования тест-систем на основе РКОА в производственном процессе и для контроля вакцинных препаратов необходима стандартизация технологии их изготовления и разработка системы обработки результатов.

Несмотря на несомненные достоинства, РКОА, ввиду особенностей учета результатов анализа, относится к полуколичественным методам и позволяет определять лишь ориентировочное содержание антигенов в препарате.

Одним из серологических методов точной количественной оценки является *иммуноферментный анализ (ИФА)*. Несомненным достоинством ИФА является простота выполнения и скорость получения ответа, а также небольшая стоимость при высокой чувствительности и специфичности. Объективность количественных оценок в ИФА обеспечивается инструментальным фотометрированием, при этом интенсивность регистрируемых сигналов непосредственно коррелирует с уровнем тестируемых антител или антигенов. ИФА широко используется для оценки иммунного ответа на введение вакцинных препаратов [48, 109, 189, 192, 194], серологического мониторинга за состоянием противои инфекционного иммунитета [35, 37, 39, 111, 135], в целях иммунодиагностики инфекционных заболеваний: коклюша [38, 45], туберкулеза [131], ВИЧ-инфекции [31, 59], лайм-боррелиоза [63], сибирской язвы [96], ротавирусной инфекции [40], и многих других [23, 34, 108, 121].

Благодаря своей точности, специфичности и высокой чувствительности ИФА применяют и для контроля иммунобиологических препаратов, в том числе вакцин.

Так, в Европейской Фармакопее (ЕФ) ИФА рекомендуется использовать как метод определения подлинности и специфической активности поверхностного антигена вируса гепатита В [46, 134] и D-антигена полиовирусов типа 1, 2, 3, входящих в состав комбинированных вакцинных препаратов, HPV-вакцины, имеются исследования по использованию ИФА для оценки дифтерийного [125] и столбнячного [176] анатоксинов. При этом в препарате определяется непосредственно антиген. Кроме того, с использованием метода ИФА в ЕФ рекомендуется оценивать иммуногенные свойства гепатитного, дифтерийного, столбнячного компонентов, бесклеточной коклюшной вакцины в составе комбинированных вакцинных препаратов по уровню антительного ответа иммунизированных лабораторных животных [134].

При конструировании иммуноферментных тест-систем одними из важнейших ингредиентов ИФТС, от которых зависят специфичность и чувствительность ИФА, являются искусственно синтезированные конъюгаты антител или антигенов с ферментами.

В настоящее время широко применяются методы ИФА, в которых в качестве маркера наиболее часто используется катионный изофермент пероксидазы хрена (ПХ). Однако ПХ не всегда оптимальна для аналитического применения, в частности, при создании высокочувствительных систем со стабильным сигналом [21]. Могут иметь место неспецифические взаимодействия между энзиммеченным иммуноглобулином и с антителом, фиксированным на твердой фазе. Неспецифические реакции такого рода в значительной степени исключаются при использовании систем, в которых применяют гаптены, связанные со вторым антителом или антигеном [124]. При этом реакция заканчивается с помощью иммунореактантов, способных эффективно связываться с этим гаптенем.

Среди систем, включающих гаптен-антигаптен, особой чувствительностью отличается авидин(стрептавидин)-биотиновая [58, 126]. В такой системе иммуноглобулин или антиген ковалентно связывается с биотином, реакция проявляется конъюгатом авидина (стрептавидина) с ферментом. Основное преимущество указанной реакции обусловлено чрезвычайно высокой аффинностью авидина по отно-

шению к биотину, более чем в миллион раз превосходящую константу ассоциации антигена с антителами.

Чтобы обнаружить соединение меченых антител с антигеном, добавляют субстрат, разлагаемый присоединенным к IgG ферментом, с окрашиванием в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфатаза) цвет. Используют также ферменты, разлагающие не только хромогенный, но и люмогенный субстрат. В этом случае при положительной реакции появляется свечение.

В настоящее время разработаны и применяются многочисленные варианты иммуноферментных методов. Для определения антигенов наибольшее распространение получил так называемый «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА, в котором на твердой фазе сорбируют антитела. При этом антиген, связавшийся с фиксированными антителами, выявляют с помощью таких же антител, конъюгированных с ферментом. В литературе имеется большое количество работ по использованию этого варианта ИФА при определении самых различных антигенов, так как он отличается простотой и малым количеством этапов реакции.

Однако, для определения каждого антигена в прямой твердофазной «сэндвич»-системе требуется индивидуальный специфический энзиммеченный конъюгат.

В Пермском НПО "Биомед" имеется большой опыт по конструированию иммуноферментных тест-систем для определения бактериальных токсинов и анатоксинов. Разработаны системы для индикации ботулинических токсинов-анатоксинов типов А, В и Е [71], стафилококкового [90] и дифтерийного токсинов [81, 120] на основе F(ab)₂-фрагментов аффинноочищенных антител.

В связи с разработкой на базе НПО "Биомед" бесклеточной коклюшной вакцины при отсутствии регламентированных методов контроля нам представлялось целесообразным изучить возможность применения иммуноферментного анализа для оценки ее специфической активности. Поэтому мы поставили перед собой задачу изучить возможность конструирования иммуноферментной тест-системы для выявления коклюшных антигенов и оценить возможность ее применения в модельных экспериментах и в условиях производства. Следует отметить, что для использования

ИФА в качестве метода оценки иммунобиологических препаратов, необходимым условием является его аттестация.

Стандартизация методов контроля вакцинных препаратов

Валидация и стандартизация лежат в основе использования любого метода серологической диагностики. Это является основным условием для включения вновь разработанных тест-систем в нормативную документацию на иммунобиологические препараты.

В соответствии с современными требованиями производства лекарственных средств использование валидированных аналитических методов является обязательным условием как при разработке новых тест-систем, так и при их рутинном контроле [36, 79].

Валидация – одна из составляющих частей GMP, проведение которой гарантирует, что поддерживающие системы, оборудование, процессы и тестирование находятся на должном уровне, и поэтому производимая продукция отвечает заложенным в нормативной документации требованиям качества [16, 53, 156].

Необходимость валидации методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов определена рекомендациями ВОЗ, Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации производств лекарственных средств для человека (ICH), документами Европейского союза, Фармакопеями США, Европейского союза и др. [110, 134, 145, 154, 197], а также отечественными нормативными документами [7, 8, 9, 11, 12].

Для того чтобы аналитическая методика заняла свое место в системе качества, соответствовала своему назначению, то есть гарантировала результаты с установленной точностью, требуется ее валидация. Разработка принципов валидации методов контроля для установления характеристик методик и показателей их точности представляет актуальную задачу.

При контроле качества МИБП важное место занимают отраслевые стандартные образцы, являющиеся необходимой метрологической составляющей

системы обеспечения качества, особенно при отсутствии международных или государственных стандартных образцов [86].

Определение порядка аттестации отраслевых стандартных образцов и разработка принципов валидации количественных методов контроля составляют основу совершенствования системы обеспечения качества и безопасности биофармацевтической продукции [91, 92, 93]. В связи с этим разработка методологии, валидации и аттестации стандартных образцов, а также методических основ контроля качества вакцинных препаратов с использованием современных химических, иммунохимических методов является актуальной.

Таким образом, одним из основных направлений научных исследований в настоящее время является разработка новых эффективных диагностических и лечебно-профилактических препаратов, повышение эффективности и безопасности вакцинопрофилактики. Это, в свою очередь, влечет за собой необходимость совершенствования технологий производства и методов контроля иммунобиологических препаратов [61]. При этом необходимое условие – использование для этой цели стандартных методов и тест-систем, прошедших все стадии регистрации.

Следует отметить, проблема получения тест-систем со стандартизованными свойствами является ключевой в решении задачи совершенствования системы обеспечения качества вакцинных препаратов.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Препараты и реагенты

Анатоксин дифтерийный очищенный концентрированный производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

Анатоксин столбнячный очищенный концентрированный производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ "Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

Коклюшная суспензия инактивированная, субстанция (взвесь убитых формалином коклюшных микробов 1 фазы) производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

Диагностикум коклюшный жидкий для реакции агглютинации производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, г. Москва.

Экспериментальные серии вакцины коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции, производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

Экспериментальные серии стафилококкового бактериально-клеточного реагента производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

Гель алюминия гидроксида (ЛСР-006456/09-130809), филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

Цианбромированная сефароза 4В фирмы «GE Healthcare», Швеция.

Пероксидаза хрена высокоочищенная с RZ не менее 2,7 производства фирмы «Sigma», США.

Авидин-пероксидаза фирмы «Sigma», США.

Субстрат хромогенный фирмы «Хема», Россия.

Белок А производства фирмы «Sigma», США.

N-гидроксисукцинимидобиотин производства фирмы «Sigma», США.

Полистироловые планшеты однократного применения фирмы «Microlon Griener», Германия.

2.1.2. Вакцины

Инфанрикс - вакцина дифтерийно-столбнячная трехкомпонентная бесклеточная коклюшная адсорбированная жидкая производства GlaxoSmithKline plc, Бельгия.

Пентаксим - вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная производства Sanofi Pasteur, Франция.

АКДС-вакцина - вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

аАКДС-вакцина - вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая с ацеллюлярным коклюшным компонентом (экспериментальные серии) производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

АКДС-Геп В - вакцина для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

АКДС-Геп В+Ніb - вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная синтетическая производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

аАКДС-Геп В+Ніb - вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная синтетическая производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

АДС-М-анатоксин – вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная жидкая производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

АД-М-анатоксин – вакцина для профилактики дифтерии адсорбированная жидкая производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

АС-анатоксин - вакцина для профилактики столбняка адсорбированная жидкая производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь.

ХИБ-вакцина – вакцина для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа b, производства Индии (природный капсульный полисахарид конъюгирован со столбнячным анатоксином).

Хиберикс - вакцина для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа b, производства GlaxoSmithKline plc, Бельгия (природный капсульный полисахарид конъюгирован со столбнячным анатоксином).

АКТ-ХИБ – вакцина для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа b, производства Sanofi Pasteur, Франция (природный капсульный полисахарид конъюгирован со столбнячным анатоксином).

Quimi-Hib - вакцина против гемофильной инфекции типа b производства Кубы (синтетический полисахарид идентичный капсульному *Haemophilus influenzae* типа b конъюгирован со столбнячным анатоксином).

Гриппол – субъединичная адьювантная вакцина для профилактики гриппа производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» «Иммунопрепарат», г. Уфа.

Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая суспензия для внутримышечного введения производства ЗАО «Комбиотех», Россия.

Энджерикс В – вакцина для профилактики вирусного гепатита В производства GlaxoSmithKline plc, Бельгия.

Хаврикс – вакцина для профилактики вирусного гепатита А производства GlaxoSmithKline plc, Бельгия.

Вакцина против краснухи культуральная живая аттенуированная лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения производства ФГУП «НПО «Микроген», Россия.

2.1.3. Штаммы микроорганизмов

Staphylococcus aureus – производственный штамм Cowan I.

Bordetella pertussis - производственные штаммы №№ 39, 305, 267, 475.

Clostridium tetani – производственные штаммы №№ 228, 471.

2.1.4. Оборудование

- фотоэлектрический концентрационный колориметр КФК-2 (Россия);
- спектрофотометр Biochrom WPA Biowave II («Biochrom», Англия);
- спектрофотометр PR 2100 («Sanofi Diagnostics Pasteur», Франция);
- автоматическое промывочное устройство (вошер) («Sanofi Diagnostics Pasteur», Франция);
- центрифуга марки IEC Micromax модель RF 3593;
- центрифуга марки Beckman Coulter модель Avanti J-NC.

2.1.5. Животные

Кролики породы шиншилла весом 2,5-3,0 кг (отделение воспроизводства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь).

2.2. Методы

2.2.1. Определение белка

Метод Лоури (без предварительного осаждения белка): оптическую плотность образцов определяли на КФК-2 при длине волны 750 нм.

Спектрофотометрия: определение проводили при длине волны 280 нм.

2.2.2. Реакция флокуляции (РФ)

Реакцию ставили по общепринятой методике [77].

2.2.3. Реакция агглютинации (РА)

Проводили по общепринятой методике (микро- и макроварианты) с помощью диагностикума коклюшного жидкого для реакции агглютинации производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова (г. Москва) и коклюшной

суспензии и инактивированной производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед».

2.2.4. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Проводили по общепринятой методике в микроварианте с помощью эритроцитарных антигенных диагностикумов (экспериментальные серии, производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед») соответствующей специфичности, которые готовили глутаральдегидным методом.

2.2.5. Метод радиальной иммунодиффузии (РИД)

РИД выполняли по общепринятой методике по Mancini с использованием моноспецифических сывороток для количественного определения иммуноглобулинов сыворотки крови человека.

2.2.6. Реакция коагглютинации (РКОА)

РКОА выполняли на стекле. Приготовленные разведения исследуемого материала переносили на стекло по одной капле (10-15 мкл). Затем к этим разведениям добавляли диагностикум в равном объеме и перемешивали, осторожно покачивая стекло в руках. Результаты РКОА учитывали в пределах 5-10 мин визуально по образованию агглютинатов. Учет результатов проводили визуально по 4-х крестной системе:

(++++) — полная агглютинация, при этом в капле отмечается полное просветление реакционной смеси;

(+++) — хорошо выраженная агглютинация, явное просветление реакционной смеси;

(++) — неполная агглютинация с незначительным просветлением реакционной смеси;

(+) — слабо заметная агглютинация без просветления реакционной смеси;

(-) — отсутствие агглютинации.

Реакцию сопровождали контролем на отсутствие спонтанной агглютинации: диагностикум + 0,01 М ФСБ (фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,2-7,4).

Результаты реакции учитывали, если в контроле отсутствовала спонтанная агглютинация. За титр принимали максимальное разведение, дающее четко выраженную положительную реакцию не менее чем на «три креста» (+++).

Содержание каждого антигена в исследуемом материале определяли в сравнении с контрольными образцами. Расчет количества антигенов в препаратах проводили по следующей формуле: $Y=X \times Z$, где

Y - содержание определяемого компонента;

X – знаменатель последнего двукратного разведения исследуемого материала, в котором наблюдалась положительная реакция;

Z – показатель чувствительности диагностикума.

2.2.7. «Тормозной» вариант РКОА

Двукратные или дробные разведения исследуемого материала готовили в лунках полистироловых планшетов в объеме 50 мкл. Затем во все лунки с разведениями вносили выбранную дозу столбнячной стандартной сыворотки (1 МЕ/мл) также в объеме 50 мкл и перемешивали встряхиванием. После 1-часовой инкубации при температуре 37 °С проводили РКОА. Для этого каждое разведение по 10 мкл переносили на стекло и добавляли по 10 мкл столбнячного диагностикума. Учет результатов проводили по задержке коаггутинации опытной дозой стандартной сыворотки. В первых разведениях, где имелся избыток анатоксина по отношению к выбранной дозе стандартной сыворотки, отмечалась четкая положительная реакция, т.е. в каплях наблюдалось формирование агглютинатов. В тех же разведениях, где анатоксин полностью связывался выбранной дозой соответствующего антитоксина, агглютинация отсутствовала. Учитывая, что в первом разведении с отрицательной реакцией, в котором анатоксин нейтрализуется дозой сыворотки, соотношение анатоксина и антитоксина эквивалентное, по нему с учетом опытной дозы сыворотки (1 МЕ/мл) рассчитывали концентрацию анатоксинов (в Lf /мл).

2.2.8. Реакция бактериосорбции иммунных комплексов (РБИК)

Реакцию использовали для оценки экспериментальных серий стафилококкового реагента, содержащего белок А. Реакцию ставили на стекле, разделенных

на квадраты 2,5х2,5 см карандашом - стеклографом. Исследуемый материал (серии стафилококкового реагента) и разведения индикационного иммунного комплекса (ИК) смешивали в каплях объемом по 10-15 мкл. Осторожно покачивая стекло, сразу начинали наблюдение за результатом реакции. Учет результатов проводили визуально по 4-х крестной системе.

Реакцию сопровождали контролем на отсутствие спонтанной агглютинации: стафилококковый реагент, содержащий белок А, + 0,01 М ФСБ.

Результаты реакции учитывали, если в контроле отсутствовала спонтанная агглютинация. За титр принимали максимальное разведение ИК, дающее четко выраженную положительную реакцию не менее чем на «три креста» (+++).

2.2.9. Аффинная хроматография

Для аффинной хроматографии использовали колонку размером 10× 100 мм, детектор (Uvicord LKB Bromma 2238, Швеция, λ 280 нм) и коллектор фракций (Multirack LKB Bromma 2111, Швеция).

2.2.10. Гельхроматография

Гельхроматографию выполняли на ультрагеле AcA-44, используя оборудование для хроматографии фирмы «LKB» (Швеция). Колонки уравнивали борно-боратным буферным раствором с pH=8,0. Хроматографическое разделение осуществляли при помощи одноэтапной элюции борно-боратным буферным раствором с pH=8,0. Фракции отбирали с помощью автоматического коллектора «Multirac» с проточным УФ-детектором «Uvicord S-II» при длине волны 280 нм.

2.2.11. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

ВЭЖХ выполняли с помощью жидкостного хроматографа, включающего:

- хроматографическую колонку Superdex 200 10/300 GL;
- изократический насос для подачи подвижной фазы в системе под давлением (Knauer Smartline 1000);
- ультрафиолетовый детектор (Knauer Smartline 2550), рабочая длина волны 280 нм;
- инжектор (Knauer);

- компьютер с установленной программой сбора и обработки хроматографических данных (Clarity Chrom);

- дегазатор.

Подвижная фаза (ПФ): 0,05 М калийно-фосфатный буферный раствор с 0,15 М натрия хлорида и 0,003 М натрия азиды, объем вводимой пробы - 20 мкл, время регистрации хроматограммы - 60 мин.

2.2.12. Иммуноферментный анализ

Реакцию иммуноферментного анализа для выявления дифтерийных, столбнячных и коклюшных антител в кроличьих сыворотках с использованием экспериментальных тест-систем проводили по следующей схеме:

1. Для сорбции планшета в каждую лунку вносили по 0,1 мл раствора соответствующего антигенного препарата (анатоксина дифтерийного, анатоксина столбнячного, субстанции бесклеточной коклюшной вакцины) в карбонат-бикарбонатном буферном растворе 10 мкг/мл. Планшет инкубировали при температуре (4 ± 2) °С в течение суток.

2. После сорбции планшеты отмывали от несвязавшихся компонентов фосфатным буферным раствором с твином и блокатором, рН $(7,2\pm 0,2)$ (ФСБ-Т-Б) 2 раза по 0,5 мл с помощью вошера, либо 4 раза по 0,25 мл с помощью многоканального дозатора.

3. Далее в лунки планшета вносили контрольные образцы по 0,1 мл (положительный и отрицательный) в рабочих разведениях и исследуемые кроличьи сыворотки. Планшет закрывали и инкубировали в течение 60 минут при температуре (37 ± 2) °С.

4. После инкубации планшеты отмывали как описано выше (п. 2).

5. В лунки отмытого планшета вносили конъюгат, представляющий собой белок А, меченный пероксидазой хрена, по 0,1 мл в рабочем разведении. Планшет закрывали и инкубировали в течение 60 минут при температуре (37 ± 2) °С.

6. После инкубации планшеты отмывали как описано выше (п. 2).

7. В каждую использованную лунку планшета вносили по 100 мкл коммерческого субстрата R055Z (Хема, Россия). Планшет выдерживали при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин в защищенном от света месте.

8. Реакцию останавливали внесением в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента (5 % раствора серной кислоты).

Реакцию иммуноферментного анализа для оценки специфической активности субстанции бесклеточной коклюшной вакцины проводили в соответствии с разработанной методикой (гл. 5.2.).

Результаты ИФА регистрировали на спектрофотометре PR 2100 производства фирмы “Sanofi Diagnostics Pasteur” (Франция) при двух длинах волн 450/620 нм.

Определение специфической активности субстанции бесклеточной коклюшной вакцины проводили по градуировочному графику, построенному в координатах: y – \lg оптической плотности положительного контрольного образца, x – \log_2 кратности его разведения (рис. 1).

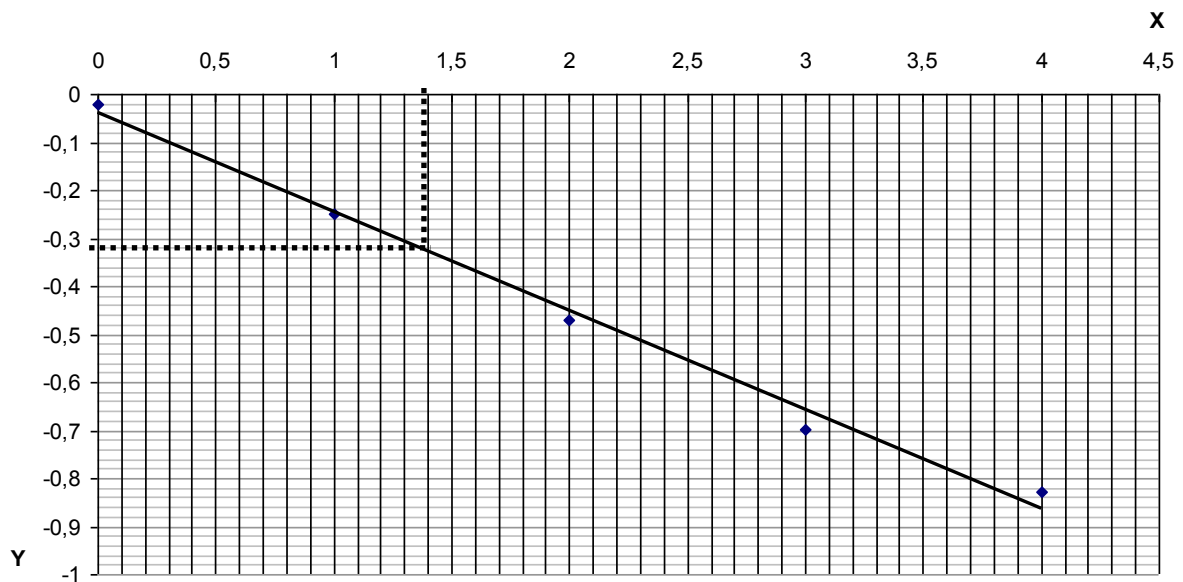


Рис. 1. Градуировочный график

Далее находили специфическую активность в исследуемом образце по следующей формуле:

$$T = \frac{T_1 \times B}{A \times C}, \text{ где}$$

T – специфическая активность в исследуемом образце, ИЕ/мл; T_1 – специфическая активность в положительном контрольном образце; A – кратность разведения положительного контрольного образца, найденная по таблице; C – разведение положительного контрольного образца, деленное на кратность; B – разведение исследуемого образца, в котором определялась оптическая плотность.

Кроме того, была использована компьютерная программа количественного определения специфических антител и антигенов, созданная на основании разработанного алгоритма обработки результатов ИФА [57].

Следует отметить, что учет результатов иммуноферментной реакции стандартизован таким образом, что позволяет оценить специфическую активность в ИЕ/мл (иммуноферментные единицы).

2.2.13. Лиофильное высушивание реагентов

Стафилококковую суспензию или специфические реагенты переводили в наполнитель и разливали во флаконы. Флаконы ставили в металлические кассеты и закрывали бязевыми салфетками.

Сушку проводили в сублимационной установке LZ-45.27 (гл. 4.2.).

2.2.14. Биологические методы с использованием животных

Работа выполнена на кроликах породы "шиншилла" массой 2-2,5 кг. Животных содержали при комнатной температуре, двухразовом питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам, при неограниченном доступе к воде. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург,

1985). Иммунизацию животных проводили согласно разработанным схемам (гл. 3.1.).

2.2.15. Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов был проведен с использованием методов описательной статистики. В работе использовали электронные таблицы Excel для Windows (Microsoft), а также компьютерную программу "Minitab16". Результаты, полученные при проведении иммуноферментного анализа, обрабатывались с помощью компьютерной программы «Паралайн», разработанной в ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России, которая прошла тестирование в Национальном Институте Биологических Стандартов (Англия) и в Европейском Центре ВОЗ (Дания). Данная программа базируется на нескольких принципах: сравнение со стандартным образцом, метод разведения, линейность, параллельность и дисперсионный анализ. При оценке валидационных характеристик тест-систем каждый образец анализировали не менее 3 раз (внутрипостановочный коэффициент вариации, ВКВ), а также с использованием разных серий тест-систем и сменой оператора в различные дни (межпостановочный коэффициент вариации, МКВ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ
ГЛАВА 3
ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ
ДЛЯ КОНТРУИРОВАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ

3.1. Получение гипериммунных кроличьих сывороток

В основе серологического анализа лежит комплементарное взаимодействие между антигеном и антителом, строго специфичное и быстро протекающее во времени. При конструировании диагностических тест-систем, рассчитанных на выявление антигенов, основными индикационными препаратами являются антитела. От их качества полностью зависит чувствительность и специфичность анализа, при этом важным моментом является процесс получения антител с высокой активностью (аффинностью и авидностью).

Поэтому первым этапом наших исследований по разработке коаггутинационного набора и иммуноферментной тест-системы было получение и подбор иммунных сывороток для выделения антител.

При этом для приготовления коаггутинационных реагентов необходимы сыворотки, активно взаимодействующие с белком А. Основное требование к таким сывороткам - высокая специфическая активность, обеспеченная преимущественно иммуноглобулином класса G. Установлено, что IgG, для Fc-фрагментов которых характерна способность связываться с белком А, присутствуют в сыворотке крови 65 видов млекопитающих и 18 видов других позвоночных животных [188]. Однако IgG разных животных могут значительно различаться по степени связывания с белком А и содержанию активных Fc-фрагментов иммуноглобулиновых молекул. Известно, что высоким сродством к белку А обладают иммуноглобулины кролика.

Поэтому для получения гипериммунных антитоксических сывороток нами были апробированы различные схемы иммунизации кроликов дифтерийным и столбнячным очищенными анатоксинами. Поскольку очищенным анатоксинам свойственна относительно невысокая иммуногенность, с целью стимуляции им-

мунного ответа у животных применяли цикловую иммунизацию с предварительным грунди́рованием, используя адъюванты (полный или неполный адъювант Фрейнда, гель алюминия гидроксида). Наши исследования охватывали наблюдения более чем на 100 животных. Анализ сывороток проводили с помощью РНГА. Результаты испытания различных схем иммунизации представлены в таблице 2.

Таблица 2

Схемы иммунизации кроликов для получения гипериммунных противодифтерийных и противостолбнячных сывороток

Схема иммунизации	Результаты титрования противодифтерийных сывороток (РНГА)*	Результаты титрования противостолбнячных сывороток (РНГА)*
Схема 1: Адъювант: гель гидроксида алюминия. Грунди́рование: 30 ЛФ – 100 ЛФ анатоксина в/м. I цикл иммунизации (через 3-4 недели): до 6 инъекций (подкожно) нарастающих доз анатоксина (10, 20, 30, 40, 50, 60 ЛФ), с интервалом в 3-5 дней. II - IV цикл иммунизации (через 2 недели): по 2-4 инъекции (подкожно) в дозах анатоксина 20-50 ЛФ.	135353,26 [104631,52 ÷ 175095,48]	62413,5 [37064,77 ÷ 87762,23]
Схема 2: Адъювант: Полный адъювант Фрейнда (ПАФ). I иммунизация: 3 инъекции (1-2 в/м, 3 - в/бр) в дозе анатоксина 75 ЛФ. II иммунизация (через 3-4 недели): 1 инъекция (в/м) в дозе анатоксина 150 ЛФ.	9050,97 [6971,91 ÷ 11751,2]	12800 [9800 ÷ 15800]
Схема 3: I иммунизация: 2 инъекции (в/м) в дозе 40 ЛФ анатоксина с ПАФ и гелем гидроксида алюминия. II иммунизация (через 4 недели): 2 инъекции (в/м) в дозе анатоксина 400 ЛФ с гелем гидроксида алюминия.	25600 [15186,7 ÷ 43153,5]	42001,17 [32563,85 ÷ 51438,49]
Схема 4: Адъювант: ПАФ Грунди́рование: ПАФ в подушечку лапки. I иммунизация (через 2-3 недели): 3 инъекций одновременно (в/м, в/бр., в подушечку лапки) в дозе анатоксина 50 ЛФ с ПАФ. II иммунизация (через 3 недели): 1 инъекция (в/м) в дозе анатоксина 80 ЛФ с ПАФ; 2 инъекция 20 ЛФ анатоксина (в/в).	12800 [8541,81 ÷ 19180,9]	8613,76 [5290,48 ÷ 11937,04]

Примечание: * величина, обратная разведению сыворотки

Лучшие показатели продукции антител были у кроликов, иммунизированных по схемам 1 и 3, причем в ряде групп отмечалась положительная сероконвер-

сия у 100 % животных. При иммунизации по схеме 1 после второго цикла средняя геометрическая титра дифтерийных антител у 40 % животных составляла 1:135353,26, а столбнячных антител – 62413,5. При этом высокие титры оставались в течение длительного времени на стабильном уровне, что позволяло использовать этих животных в качестве продуцентов гипериммунных сывороток.

Отдаленная реиммунизация, как правило, давала выраженный "бустер"- эффект, но дозы анатоксина при каждой инъекции необходимо было подбирать в зависимости от индивидуальной реактивности кроликов. Высокие титры были получены и при иммунизации кроликов по схеме 3. Однако, на последующих циклах при введении как малых, так и больших доз анатоксина титры антител у животных стабилизировать не удавалось. У этих животных отмечался и слабый "бустер"- эффект. После окончания иммунизации средняя геометрическая титра дифтерийных антител составляла 1:25600, а столбнячных – 42001,17. Достоинство этой схемы заключалось в относительно быстром нарастании титров, хотя срок полезной эксплуатации животных этой группы был небольшим. В последующих опытах для получения противокклюшных сывороток брали за основу схемы 1 и 3.

Для получения гипериммунных противокклюшных сывороток животных иммунизировали как клеточным, так и бесклеточным антигенами. Сыворотки анализировали в реакции агглютинации, а также определяли титр с применением разработанной нами экспериментальной иммуноферментной тест-системы на основе белка А, меченного пероксидазой хрена (табл. 3).

У кроликов, иммунизированных по обеим схемам, отмечалась положительная сероконверсия у 100 % животных. При этом высокие титры антител в сыворотках 60 % иммунизированных животных оставались длительно на стабильном уровне.

Схемы иммунизации кроликов для получения
противококлюшных сывороток

Схема иммунизации	Результаты титрования сывороток (РА)*	Результаты титрования сывороток (ИФА)*
<p>Иммунизация клеточным антигеном: Первый цикл иммунизации включал 4 инъекции с интервалом 5-7 дней. Для первой и второй инъекции использовали коклюшную суспензию, разведенную до концентрации 2,5 МОЕ/мл. Каждому животному вводили антиген в объеме 2 мл подкожно по 1 мл в разные участки тела. Для 3-й и 4-й инъекции коклюшную суспензию разводили до концентрации 5 МОЕ/мл и вводили подкожно в объеме 2 мл на одного кролика (по 1 мл в разные участки тела). Второй цикл иммунизации проводили через 2 недели после окончания первого. Цикл включал 2 инъекции с интервалом 5-7 дней. Коклюшную суспензию, разведенную до концентрации 5 МОЕ/мл, вводили внутривенно (1 мл) и подкожно (1 мл) каждому животному. Дальнейшую вакцинацию вели под контролем динамики антителообразования. В зависимости от титра антител проводили вакцинацию аналогично 2-му циклу иммунизации.</p>	12800 – 102400	≥25600
<p>Иммунизация бесклеточным комплексом антигенов: I иммунизация: 2 инъекции (в/м) в дозе 100 мкг бесклеточного коклюшного компонента с ПАФ и гелем гидроксида алюминия. II иммунизация (через 4 недели): по 2 инъекции (в/м) в дозе 400 мкг с гелем гидроксида алюминия.</p>	25600 – 102400	≥51200

Примечание: * величина, обратная разведению сыворотки

Таким образом, из представленных данных видно, что указанные схемы иммунизации кроликов, как клеточным, так и бесклеточным антигеном, обеспечивают получение гипериммунных сывороток с высоким титром специфических антител.

Последующий анализ сывороток, как антитоксических, так и противококлюшных, проводили на основании оценки их истощения белком А. При заключительном отборе антитоксических сывороток дополнительно использовали реакцию флокуляции. Высокоактивные сыворотки имели максимальные титры по флокуляции 50-100 МЕ/мл, среднетитровые - 10-40 МЕ/мл.

Ранее в работах Райхера Л.И. с соавторами было отмечено, что рутинная методика получения стафилококковых реагентов с использованием нативных сывороток не обеспечивает полного выявления высоких потенциальных возможностей РКОА, в связи с чем для приготовления коаггутинационных диагностикумов была показана целесообразность использования аффинноочищенных антител. Известно, что в гипериммунной сыворотке антитела заданной специфичности составляют около 20% от общего количества иммуноглобулинов, соответственно и на поверхности клеток стафилококка они могут фиксироваться в эквивалентной дозе. Следовательно, информативность теста повышается при создании стафилококкового реагента с узконаправленной специфичностью за счет иммобилизации на белке А иммуноглобулинов только одной (заданной) специфичности.

В связи с этим нами были выполнены эксперименты по выделению высокоочищенных специфических иммуноглобулинов с помощью аффинной хроматографии из противодифтерийной, противостолбнячной и противокклюшной кроличьих сывороток.

3.2. Конструирование антигенных иммуносорбентов, отработка условий выделения аффинноочищенных антител

Первоначально в работе были испытаны два вида иммуносорбентов: на основе геля алюминия гидроксида (ЛСР-006456/09-130809) и на основе цианбромированной сефарозы 4В («HealthCare» (Швеция). В сравнительных экспериментах иммуносорбент, приготовленный с использованием геля гидроксида алюминия, на котором антиген фиксирован за счет сорбционных связей, оказался менее пригодным для выделения антител, особенно из относительно низкотитровых сывороток. В дальнейших опытах по отработке оптимальных условий приготовления высокочувствительных иммуносорбентов использовали цианбромированную сефарозу 4В.

При этом учитывались рекомендации фирмы-изготовителя, а также опыт получения иммуносорбентов в Пермском НПО «Биомед [29].

В качестве специфических лигандов использовали очищенные концентрированные дифтерийный и столбнячный анатоксины, а также субстанцию бесклеточную

точной коклюшной вакцины. Полноту связывания лиганда с матрицей оценивали по определению несвязавшегося белка в надосадочной жидкости и промывных водах, измеряя концентрацию белка спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Методика включала следующие этапы:

- последовательная отмывка сефарозы от консерванта 0,001 М раствором соляной кислоты и водой очищенной;

- сорбция лиганда на сефарозе с использованием 0,1 М карбонат-бикарбонатного буферного раствора (рН 9,0±0,1) при температуре от 2 до 8 °С с последующей отмывкой несвязавшегося антигена;

- блокирование свободных активных групп цианбромированной сефарозы трис-НСI буферным раствором (рН 8,0±0,1) с последующей трехкратной отмывкой иммуносорбента чередующимися буферными растворами: ацетатным (рН 4,0±0,1) и борно-боратным (рН 8,0±0,1).

В ходе выполненных исследований установлено, что предварительное изоосаждение антигенов с использованием натрия хлорида, а также их концентрирование до 3 – 5 мг/мл способствует повышению уровня связывания с матрицей с 50-60 % до 95-100 % для дифтерийного (АД) и столбнячного (АС) анатоксинов и с 10 до 90-95 % для антигенной фракции *Bordetella pertussis* (КАГ) (табл. 4). При этом установлено, что оптимальная нагрузка иммуносорбента по белку достигается при соотношении 10 мг антигена на 1 г сухой цианбромированной сефарозы.

Определение уровня связывания лигандов
с цианбромированной сефарозой 4В

Антиген	До переосаждения			После переосаждения		
	Содержание белка в исходном антигене, мг/мл	Содержание несвязавшегося белка в надосадочной жидкости, мг/мл	% связывания	Содержание белка в исходном антигене, мг/мл	Содержание несвязавшегося белка в надосадочной жидкости, мг/мл	% связывания
АД с. 115	2,6	1,4	46,2	4,2	0,2	95,2
КАГ с. 15	1,1	1,0	10	4,0	0,3	92,5

При получении антител для коаггутинационных диагностикумов использовали бесколоночный «batch» -метод аффинной хроматографии, так как он позволяет быстро и эффективно проводить стадии промывания и элюции. Исходным материалом служили кроличьи сыворотки, полученные по ранее отработанным схемам.

Иммуносорбент и антитоксическую сыворотку соответствующей специфичности соединяли в количествах, эквивалентных по титру (Lf для столбнячной и дифтерийной сывороток). Истощение сыворотки сорбентом проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. После отмывки сорбента 0,01 М калийно-фосфатным буферным раствором (рН 7,4±0,1) проводили элюцию антител при рН 2,4±0,1. Полученные элюаты нейтрализовали 1М раствором натрия гидроксида до рН 7,4±0,1. Использованный иммуносорбент регенерировали последовательным отмыванием в кислом калийно-фосфатном буферном растворе (рН 2,4±0,1) и калийно-фосфатном буферном растворе с рН 7,4±0,1. Отмытый сорбент уравнивали в последнем растворе и хранили при температуре от 2 до 8 °С в присутствии консерванта 0,01 % азида натрия.

В элюатах антител определяли белок (спектрофотометрически при длине волны 280 нм), специфический титр (в реакциях флокуляции или ИФА), рассчитывали удельную активность и коэффициент очистки.

Таким образом, проведенными экспериментами была обоснована оптимальная схема иммуноаффинного выделения специфических антител из гипериммунных кроличьих сывороток (рис. 2).

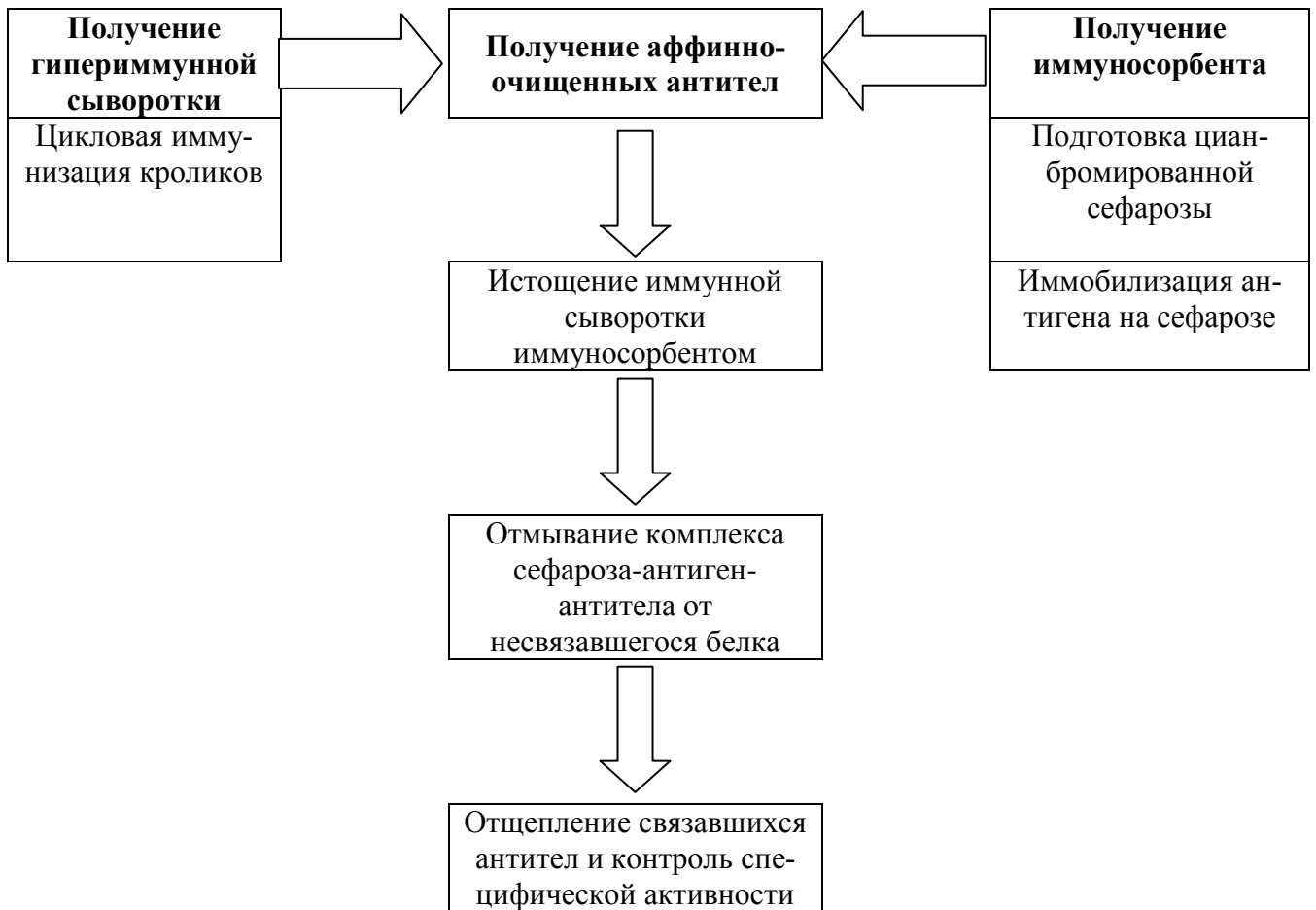


Рис. 2. Схема получения аффинноочищенных антител

На примере анализа полученных дифтерийных и столбнячных антител показано, что удельная активность аффинноочищенных антител по сравнению с исходной сывороткой увеличивается в 20 – 50 раз (табл. 5).

Оценка степени очистки дифтерийных и столбнячных
антител из кроличьих сывороток

Специфичность	№ сыворотки	Удельная активность исходной сыворотки (mME/1 мг белка)	Удельная активность афинноочищенных антител (mME/1 мг белка)	Коэффициент очистки
Дифтерийные	1	1020	22700	22
	2	1200	27000	23
	3	1100	25000	23
	4	1380	27000	20
	5	550	28000	50
	6	570	33000	58
	7	430	17000	40
	8	350	14300	40
M±m		825,0±394,0	24250±6100,0	34,5±14,6
Столбнячные	1	840	22700	27
	2	1010	27000	27
	3	1280	29000	23
	4	1030	23000	22
	5	600	21000	35
	6	1350	28600	21
	7	450	12500	27
	8	590	17400	28
M±m		894,0±310,0	22650±5340,0	26,3±4,2

Таким образом, разработанные нами высокочистые сефарозные иммуносорбенты (дифтерийный, столбнячный) позволяли получать высокоочищенные антитела из гиперимунных кроличьих сывороток.

Анализ методом гельхроматографии на ультрагеле AcA-44, а также методом ВЭЖХ (на рис. 3 приведены результаты хроматографии стандартов молекулярной массы) подтвердил высокую степень очистки и монофракционность выделенных дифтерийных и столбнячных антител, представляющих собой иммуноглобулины

класса G (на рис. 4а и 4б представлены хроматографическая кривая и данные компьютерной обработки результатов ВЭЖХ).

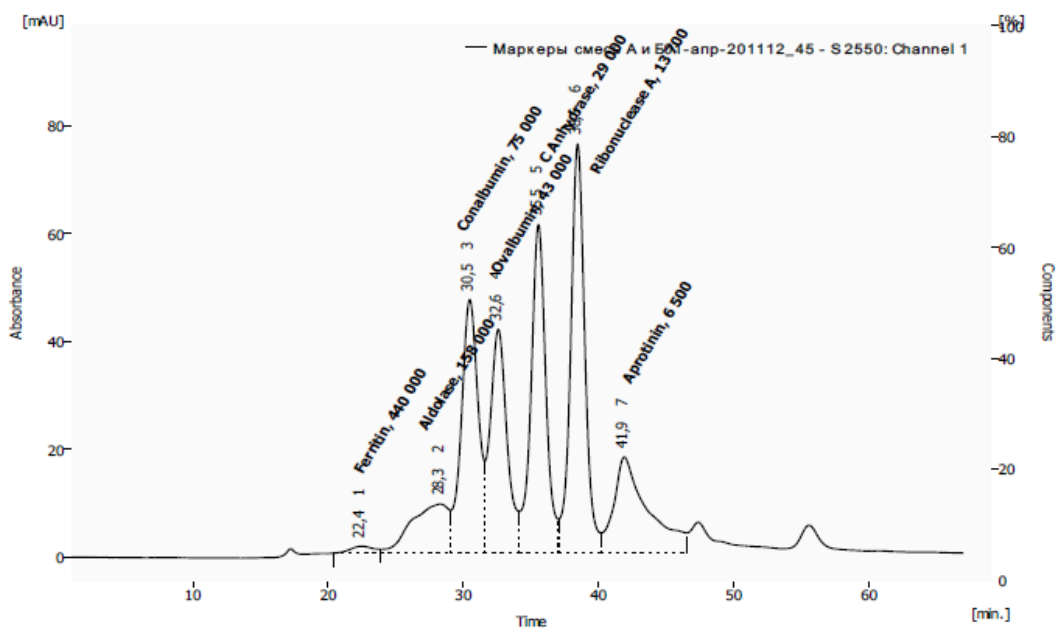
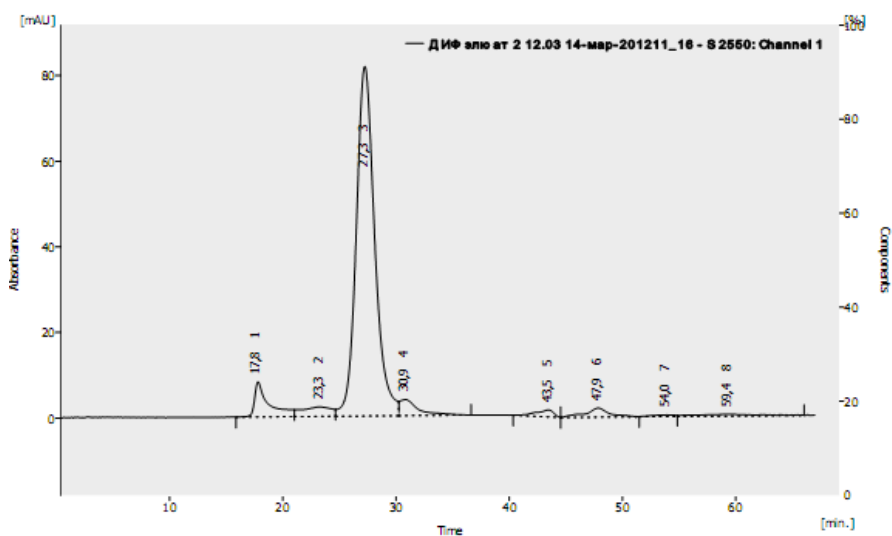


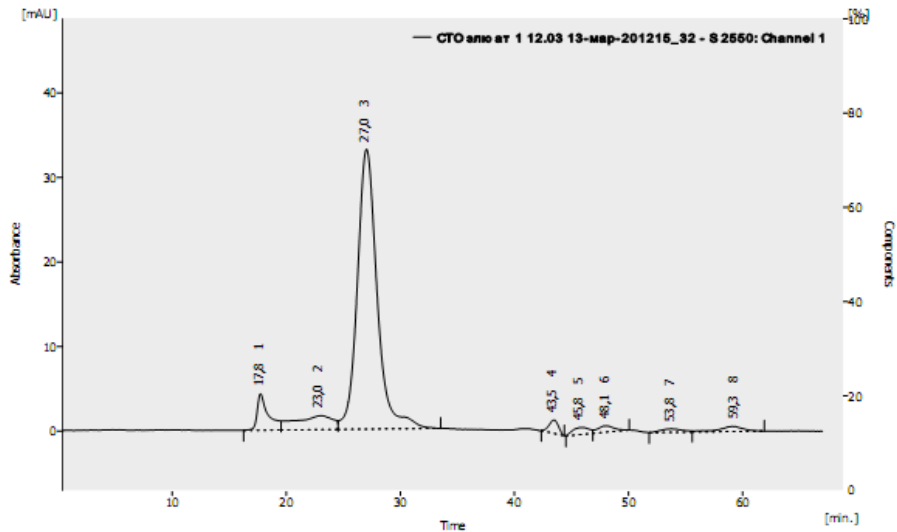
Рис. 3. Хроматографический профиль стандартов молекулярной массы



Result Table (Uncal - ДИФ антит 2 12.03 14-мар-201211_16 - S 2550: Channel 1)

	Reten. Time (min)	Start Time (min)	End Time (min)	Area (mAU s)	Height (mAU)	Area (%)	Height (%)
1	17,800	15,867	21,033	728,652	8214	6,3	8,2
2	23,267	21,033	24,667	408,460	2230	3,5	2,2
3	27,250	24,667	30,250	9286,946	81,669	80,2	81,3
4	30,900	30,250	36,633	436,236	3756	3,8	3,7
5	43,483	40,350	44,550	176,862	1636	1,5	1,6
6	47,900	44,550	51,483	316,062	2128	2,7	2,1
7	53,967	51,483	54,850	58,779	0,419	0,5	0,4
8	59,350	54,850	66,050	174,807	0,464	1,5	0,5
Total	Total	Total	Total	11586,428	100,507	100,0	100,0

Рис. 4а. Хроматографический профиль дифтерийных кроличьих антител, полученных batch-методом



Result Table (Uncal - CTO ano at 1 12.03 13-мар-201215_32 - S 2550: Channel 1)

Reten. Time [min]	Start Time [min]	End Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]
1	17,750	18,267	19,550	4,300	5,8	9,9
2	22,863	19,550	24,533	376,366	1,646	7,5
3	27,033	24,533	29,533	4007,479	39,094	79,0
4	43,467	42,350	46,367	90,714	1,575	3,6
5	45,533	44,500	46,867	82,550	0,825	1,6
6	48,100	46,867	50,050	76,432	0,753	1,5
7	53,767	51,817	55,583	54,771	0,415	1,1
8	59,317	55,583	61,900	92,345	0,607	1,3
Total	Total	Total	5075,399	49,215	100,0	100,0

Рис. 4б. Хроматографический профиль столбчатых кроличьих антител, полученных batch-методом

Далее отработанная схема получения аффинноочищенных антител была распространена с некоторыми коррективами и на получение антител из противокклюшных кроличьих сывороток. Для этого предварительно нами были проведены эксперименты по подбору соотношения количества коклюшного иммуносорбента и объема противокклюшной кроличьей сыворотки с определенной специфической активностью, учитывая степень истощения сыворотки и содержание белка в элюируемых антителах.

Показано, что высокая емкость приготовленных коклюшных иммуносорбентов обеспечивает получение аффинноочищенных антител с высокой удельной активностью, в 8-12 раз превышающей удельную активность исходной сыворотки.

Характеристика аффинноочищенных коклюшных антител, полученных по разработанной технологии, представлена в таблице 6.

Характеристика аффинноочищенных коклюшных антител

№ серии сыворотки	Удельная активность исходной сыворотки (УИЕ* на 1 мг белка)	Удельная активность очищенных антител (УИЕ на 1 мг белка)	Коэффициент очистки
1	6153,8	68922,7	11,2
2	5970,3	63285,2	10,6
3	5556,0	53893,2	9,7
4	5128,2	62051,2	12,1
5	5714,3	60000,2	10,5
6	6349,0	55236,3	8,7
7	6259,0	56956,9	9,1
8	6061,0	52730,7	8,7
M±m	5899,0±409,6	59134,5±5486,5	10,08±1,24

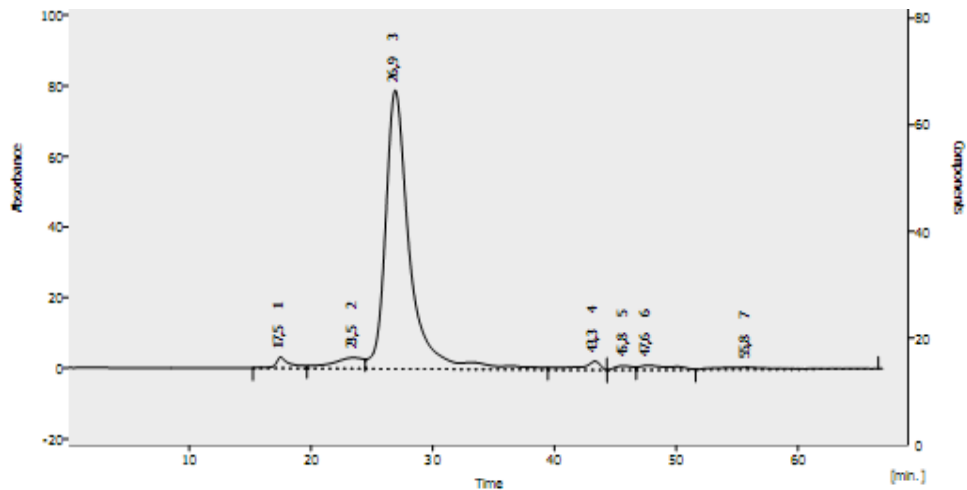
Примечание:* - условные иммуноферментные единицы

Таким образом, разработанная технология выделения антител с использованием batch-метода обеспечивает получение аффинноочищенных антител с достаточно высокой удельной активностью и степенью очистки.

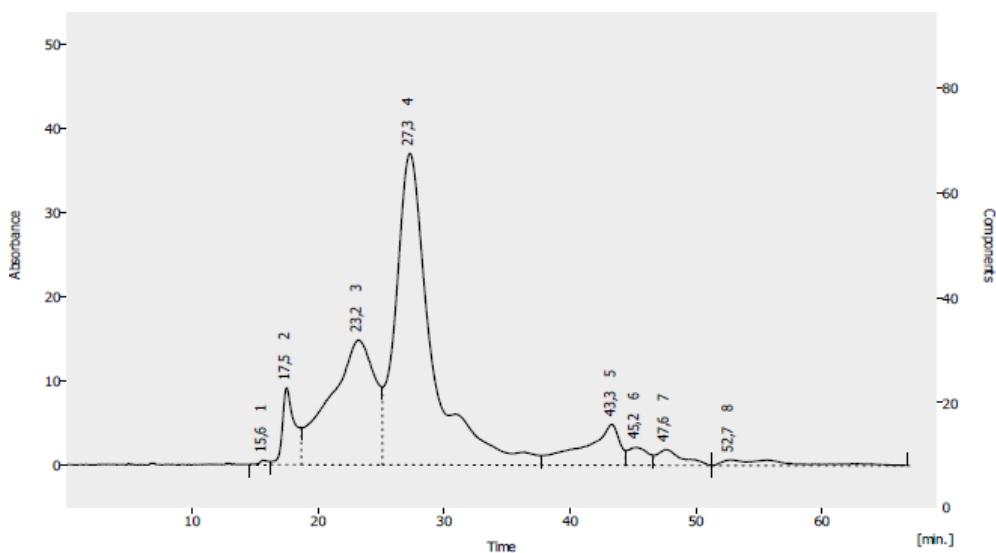
На следующем этапе нашей работы мы предприняли попытку получения антительных препаратов с использованием колоночного метода аффинной хроматографии. Достоинством данного способа выделения антител является возможность избирательного получения отдельных фракций с высокой активностью и с высокой концентрацией белка, соответствующих максимальным значениям оптической плотности хроматографической кривой, что имеет важное значение при конструировании конъюгатов для иммуноферментных тест-систем.

В этом случае мы собирали отдельные фракции антител минимального объема, регистрируя изменение значений оптической плотности элюируемого материала, после чего все образцы оценивали с помощью метода ВЭЖХ. Процесс элюции проводили с использованием кислого калийно-фосфатного буферного раствора с рН 2,4±0,1. При этом фракции антител условно делили на «восходящие» (собранные в процессе элюции при увеличении оптической плотности) и «нисходящие» (собранные в процессе элюции при снижении оптической плотности). Было показано, что хроматограмма «восходящих» антительных фракций представлена одним четковыраженным пиком, соответствующим IgG, площадь

которого составляет 85-90 % (рис. 5а). В то же время, по результатам ВЭЖХ образцы, содержащие фракции с максимальным значением оптической плотности и «нисходящие» фракции, гетерогенны по составу. Наряду с основным пиком хроматографической кривой, соответствующим мономерной форме молекулы IgG, площадь которого составляет около 55 %, выявляются пики, соответствующие полимерной и димерной форме иммуноглобулина (время удерживания – около 15-25 мин), а также более «легким» формам, вероятно, представляющим собой фрагменты молекулы IgG (время удерживания 43,3, 45,2, 47,6 и 52,7 мин) (рис. 5б).



а



б

Рис. 5. Хроматографический профиль «восходящих» (а) и «нисходящих» (б) антительных фракций

Таким образом, собирая определенные фракции в соответствии с результатами ВЭЖХ, возможно получить монофракционные антитела с наиболее высокой степенью очистки. Используя batch-метод, это сделать не представляется возможным ввиду того, что в данном случае элюция антител происходит одновременно. Однако этот вариант аффинной хроматографии имеет свои преимущества, такие как быстрота, легкость в выполнении, а также возможность получения больших объемов антител за короткий промежуток времени.

Использование одного из двух указанных методов аффинной хроматографии диктуется целью применения получаемых антител. При конструировании точной, количественной иммуноферментной тест-системы с высокой специфичностью встает необходимость применения для получения конъюгата антительной составляющей с наибольшей степенью чистоты в мономерной форме. Кроме того, отсутствие примесей иммуноглобулиновых фрагментов в антительных препаратах имеет большое значение при использовании их для приготовления иммуносорбента – твердофазного компонента ИФТС, так как в случае применения препаратов антител, содержащих примеси низкомолекулярных фрагментов иммуноглобулиновых молекул, в частности Fc-фрагментов, которые, адсорбируясь на поверхности планшета, могут стать причиной неспецифических взаимодействий и снижения чувствительности метода.

Процесс приготовления коаггутинационных диагностикумов включает этап связывания иммуноглобулинов с белком А бактериально-клеточного реагента с последующей отмывкой несвязавшихся или слабоаффинных компонентов и возможных низкомолекулярных примесей. В связи с этим, при получении антительной составляющей для конструирования тест-системы на основе реакции коаггутинации целесообразно использование более простого и быстрого batch-метода, позволяющего одновременно выделять большие объемы антител.

Далее на следующем этапе исследований полученные аффинноочищенные антительные препараты мы использовали при разработке тест-систем на основе экспрессных методов анализа – РКОА и ИФА.

ГЛАВА 4

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-НАБОРА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИФТЕРИЙНОГО, СТОЛБНЯЧНОГО И

КОКЛЮШНЫХ АНТИГЕНОВ В РЕАКЦИИ КОАГГЛЮТИНАЦИИ

В основе реакции коагглютинации лежит взаимодействие определяемого антигена с антителами, фиксированными на естественном бактериально-клеточном иммобилизате – стафилококковой клетке, содержащей белок А. Благодаря своим биологическим свойствам, а именно способности активно взаимодействовать с IgG определенных видов млекопитающих, клетки золотистого стафилококка являются удобными носителями при создании различных тест-систем для иммуноанализа.

Основными параметрами, отражающими качество стафилококкового реагента, являются гомогенность и иммуноглобулинсвязывающая активность белка А.

4.1. Отработка технологии получения стафилококкового бактериально-клеточного реагента, содержащего белок А. Отработка методов окрашивания реагента.

Данный этап наших исследований касался отработки методов приготовления бактериально-клеточного реагента (БКР), содержащего белок А.

Наилучшим продуцентом поверхностного (клеточного) белка А считается штамм Cowan 1 золотистого стафилококка [160]. В Пермском НПО «Биомед» был разработан лабораторный вариант получения БКР [84], включающий культивирование золотистого стафилококка на твердой питательной среде, смыв стафилококковой суспензии и ее стабилизация посредством тепловой обработки и формализации.

При отработке производственного варианта получения стафилококкового реагента была использована технология реакторного культивирования в жидкой казеиново-кислотной среде, которая обеспечивает высокий уровень накопления

стафилококковых клеток, содержащих белок А. С целью очистки микробной взвеси от компонентов питательной среды и низкомолекулярных метаболитов использовали ультрафильтрацию на полых волокнах марки ВПУ-15.

Этап ультрафильтрации и все последующие стадии технологического процесса контролировали с помощью экспрессной реакции бактериосорбции иммунных комплексов (РБИК). Регламентированным методом оценки белка А является реакция радиальной иммунодиффузии (РИД), однако с помощью этого метода результаты анализа могут быть получены только через сутки, и для его выполнения требуются специальные препараты: моноспецифические диагностические и контрольные сыворотки. РБИК же позволяет получать результаты в течение нескольких минут. По данным ряда авторов [161, 162] и результатам наших исследований, иммуноглобулин Г сыворотки крови лошади практически интактен по отношению к белку А стафилококка. В тоже время нами было установлено, что нативная лошадиная антитоксическая сыворотка при соединении с гомологичным анатоксином приобретает способность активно взаимодействовать с белком А стафилококка, что проявляется в агглютинации стафилококкового реагента. Этот феномен закономерно воспроизводился с различными антитоксическими лошадиными сыворотками (противодифтерийной, противостолбнячной, противоперфрингенс, противоботулиническими) и гомологичными анатоксинами. РБИК, основанная на проявлении высокой аффинности к белку А антитоксинов лошади при их соединении с гомологичным анатоксином, проводится по типу микроагглютинации на стекле, экспрессна, удобна в выполнении. Диагностическим реагентом для этой реакции служит растворимый иммунный комплекс (ИК). Активность БКР определяется в РБИК по его агглютинабельной способности в отношении разведений ИК, имеющего внешнюю ориентацию Fc-фрагментов антительных молекул.

В предварительных опытах нами было установлено, что длительный ультрафильтрационный процесс в режиме концентрации и диафильтрации с использованием полых волокон обеспечивает высокую степень очистки стафилококковой суспензии от низкомолекулярных компонентов питательной среды и метаболитов

микроорганизмов. Однако при этом значительно снижаются седиментационные и агглютинабельные свойства стафилококковых клеток, что не позволяет получать высокоактивные реагенты для реакций на основе РКОА. При этом стоит отметить, что активность по белку А, определяемая с помощью РИД, в клетках не снижается.

Использование ультрафильтрации под контролем РБИК позволило сконцентрировать исходную нативную микробную суспензию и провести начальный этап процесса очистки от низкомолекулярных пигментированных компонентов питательной среды. При этом активность БКР по белку А, определяемая с помощью РБИК, была выше в 2-4 раза, чем при длительной ультрафильтрации. На втором этапе этой технологической стадии применили центрифугирование. Полученные концентраты БКР стандартизовали по оптической плотности.

Далее, используя РБИК, проводили стабилизацию БКР по отработанной методике, используя формализацию, а после удаления свободного формалина с помощью центрифугирования - тепловую обработку [84]. Результаты применения РБИК для контроля основных стадий технологического процесса получения БКР представлены в таблице 7.

Таблица 7

Результаты контроля технологического процесса получения БКР
с помощью РБИК

Этап технологического процесса	Исследуемый материал	Результаты РБИК (по разведению ИК)
Культивирование	Посевная бутылка	1:32
	Выемка из реактора	1:32
Ультрафильтрация	Концентрат	1:32
Стабилизация	Концентрат после обработки формалином	1:64
	Концентрат после тепловой обработки	1:64
	Концентрат после центрифугирования	1:64
Положительный контрольный образец		1:32

Таким образом, контролируя с помощью РБИК активность белка А на каждом этапе производственного процесса, мы отработали технологию, позволяющую получать бактериально-клеточный реагент с высокой иммуноглобулинсвязывающей способностью и с оптимальными агглютинабельными свойствами. Концентрация бактериально-клеточного реагента стандартизована по массе влажного осадка стабилизированных белок А-содержащих клеток и соответствует 10 %.

По разработанной технологии препарат был получен в жидком и лиофилизированном виде. В качестве консервантов использованы азид натрия или мертиолят, препараты хранили при температуре (4 - 10) °С.

Было показано, что бактериально-клеточный реагент в жидком виде сохраняет гомогенность и активность по белку А не менее 6 месяцев (срок наблюдения).

Для более длительного хранения БКР подвергали лиофилизации. С целью предупреждения снижения активности белка А и изменений физических свойств использовали сахарозо-пептонный наполнитель в качестве криопротектора.

Для лиофилизации был выбран режим, предусматривающий сверхмедленное охлаждение (менее 1 °С/мин) в течение (15±1) ч при минус 50 °С и максимально короткие этапы собственно сублимации и досушивания (рис. 6, 7). Выбранные условия способствуют максимальному снижению негативного влияния кристаллизации влаги в бактериальных суспензиях и высоких температур на структуру клеток, что обеспечивает сохранение целостности клеточной стенки и поверхностных белков стафилококка.

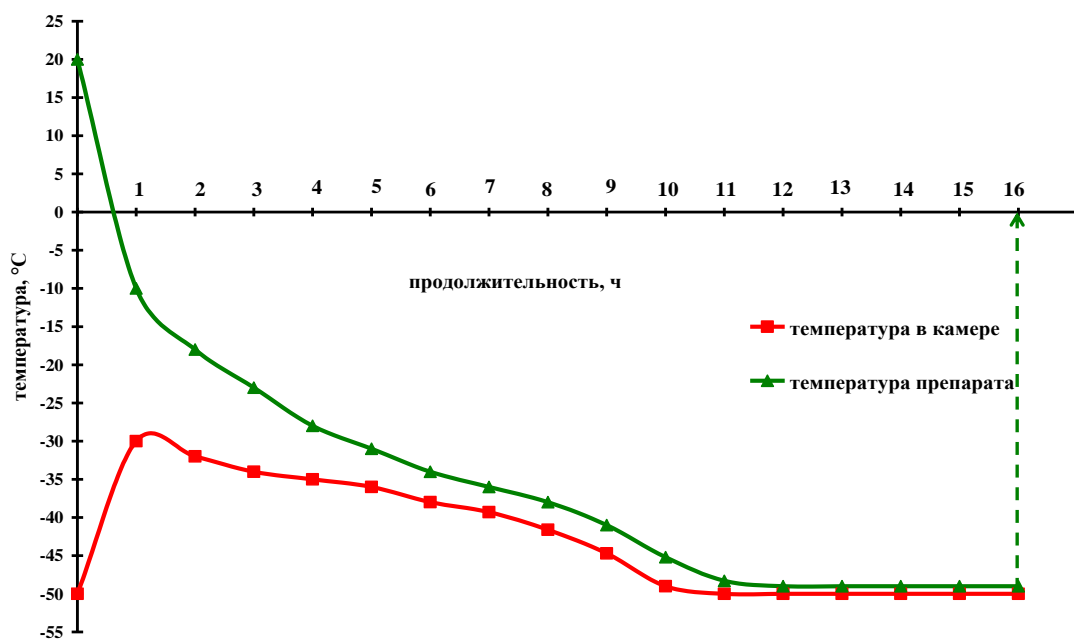


Рис. 6. Режим замораживания коагуляционных диагностикумов

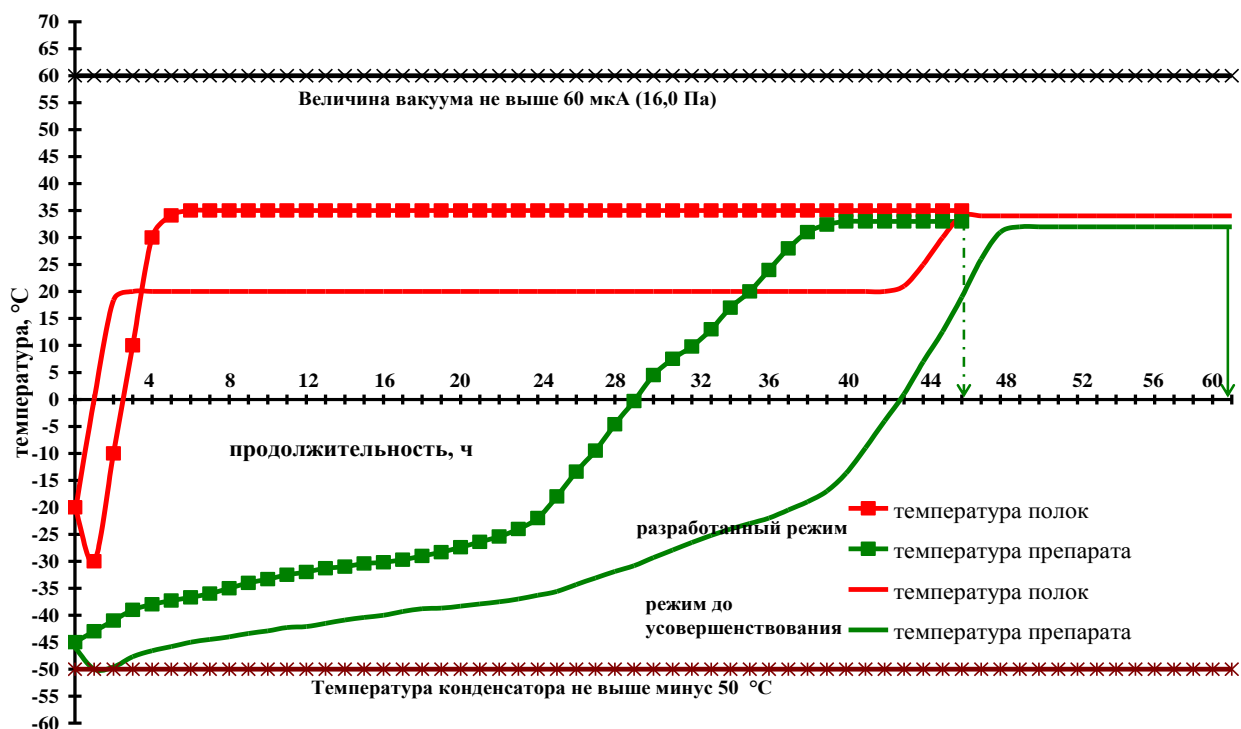


Рис. 7. Режим сублимационного высушивания коагуляционных диагностикумов

Лиофилизированный препарат быстро регидратировался с образованием гомогенной суспензии, при этом активность лиофилизированного БКР, как видно из таблицы 8, оцениваемая с помощью РИД по иммуноглобулинсвязывающей активности, не изменялась в течение 36 месяцев (срок наблюдения).

Активность лиофилизированного бактериальноклеточного реагента
в течение срока наблюдения

№ серии	Результаты РИД (мг IgG/мл 10 % стафилококкового реагента)						
	0 мес	6 мес	12 мес	18 мес	24 мес	30 мес	36 мес
Ср. геом.	1,69	1,69	1,69	1,68	1,68	1,67	1,67
Ср. откл.	0,132	0,132	0,132	0,130	0,130	0,134	0,134
Доверит. интервал	1,56– 1,82	1,5– 1,82	1,56– 1,82	1,55– 1,81	1,55– 1,81	1,54– 1,80	1,54– 1,80

Также по результатам РБИК после лиофилизации не было отмечено снижения агглютинабельных свойств БКР.

Таким образом, разработанная реакторная технология позволяет получать стабильный при хранении препарат БКР с активным белком А.

Отработка методов окрашивания реагента.

При разработке тест-набора нами были учтены современные тенденции по цветовой идентификации реагентов набора, обеспечивающие удобство работы потребителя и оптимизацию учета результатов реакции с использованием диагностикомов различной специфичности. На данном этапе работы были проведены исследования по окрашиванию БКР: подбору красителей и отработке вариантов окраски.

Окрашивание стафилококковых клеток проводили в гипотоническом растворе (ГР), обеспечивающем повышенную проницаемость клеточной стенки для красителя. ГР (0,005 М, рН 7,2-7,4) готовили с использованием фосфатных солей и хлорида натрия. В качестве красителей применяли сафранин, метиленовый синий, бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый, метилвиолет, бромтимоловый синий, нигрозин, фуксин основной, эозин, малахитовый зеленый, хризоидин в концентрации от 0,5 % до 2 % (табл. 9).

Готовили водные и спиртовые 10 % растворы красителей, которые разводили до 0,5-2 % гипотоническим раствором.

Таблица 9

Результаты окрашивания БКР

Краситель	Концентрация красителя, %	Контроль		Интенсивность окрашивания		
		Активность	Гомогенность	10% взвеси		агглютинатов в капле
				осадок	надосадочная жидкость	
Бриллиантовый зеленый	0,5	1:32	-	3+	-	2+
	1,0	1:32	-	3+	-	2+
	2,0	1:32	-	3+	-	3+
Бромтимоловый синий	0,5	1:32	-	+	-	+
	1,0	1:32	-	+	-	+
	2,0	1:32	-	2+	-	+
Кристаллический фиолетовый	0,5	1:32	2+	2+	+	2+
	1,0	1:32	2+	2+	+	2+
	2,0	1:32	3+	3+	2+	3+
Малахитовый зеленый	0,5	1:32	-	+	-	-
	1,0	1:32	-	2+	-	-
	2,0	1:32	-	2+	-	-
Метилвиолет	0,5	1:32	3+	2+	-	2+
	1,0	1:32	3+	2+	-	2+
	2,0	1:32	3+	3+	+	3+
Метилоранж	0,5	1:32	+	+	-	+
	1,0	1:32	+	+	-	+
	2,0	1:32	2+	+	-	+
Метиленовый синий	0,5	1:32	-	3+	-	2+
	1,0	1:32	-	3+	-	3+
	2,0	1:32	-	3+	+	3+
Нигрозин	0,5	1:32	+	+	-	+
	1,0	1:32	+	2+	-	+
	2,0	1:32	+	2+	-	+
Сафранин	0,5	1:32	-	3+	+	2+

	1,0	1:32	-	3+	+	3+
	2,0	1:32	-	3+	+	3+
Хризоидин	0,5	1:32	-	+	-	+
	1,0	1:32	-	+	-	+
	2,0	1:32	-	2+	-	+
Эозин	0,5	1:32	2+	2+	2+	+
	1,0	1:32	3+	2+	2+	2+
	2,0	1:32	3+	2+	2+	2+

Стафилококковые клетки обрабатывали раствором диметилсульфоксида (ДМСО) для увеличения проницаемости клеточной стенки, после чего добавляли раствор красителя, взятый в соотношении 5:1, т.е. 5 частей 10 % суспензии стафилококковых клеток, обработанных раствором ДМСО и 1 часть раствора красителя. Суспензию перемешивали с раствором красителя в течение 30 минут при комнатной температуре, прогревали 2-5 минут на кипящей водяной бане, охлаждали и добавляли глутаровый альдегид до конечной концентрации его в смеси 0,03 %. Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Для предотвращения возможной агрегации микробных клеток добавляли трис-буферный раствор (рН 8,4±0,1). После тщательного перемешивания в течение 30 мин проводили отмывание суспензии от избытка красителя центрифугированием до отсутствия окрашивания надосадочной жидкости, используя ФСБ 0,01 М, рН 7,2-7,4.

Схема приготовления окрашенного реагента представлена на рис. 8.

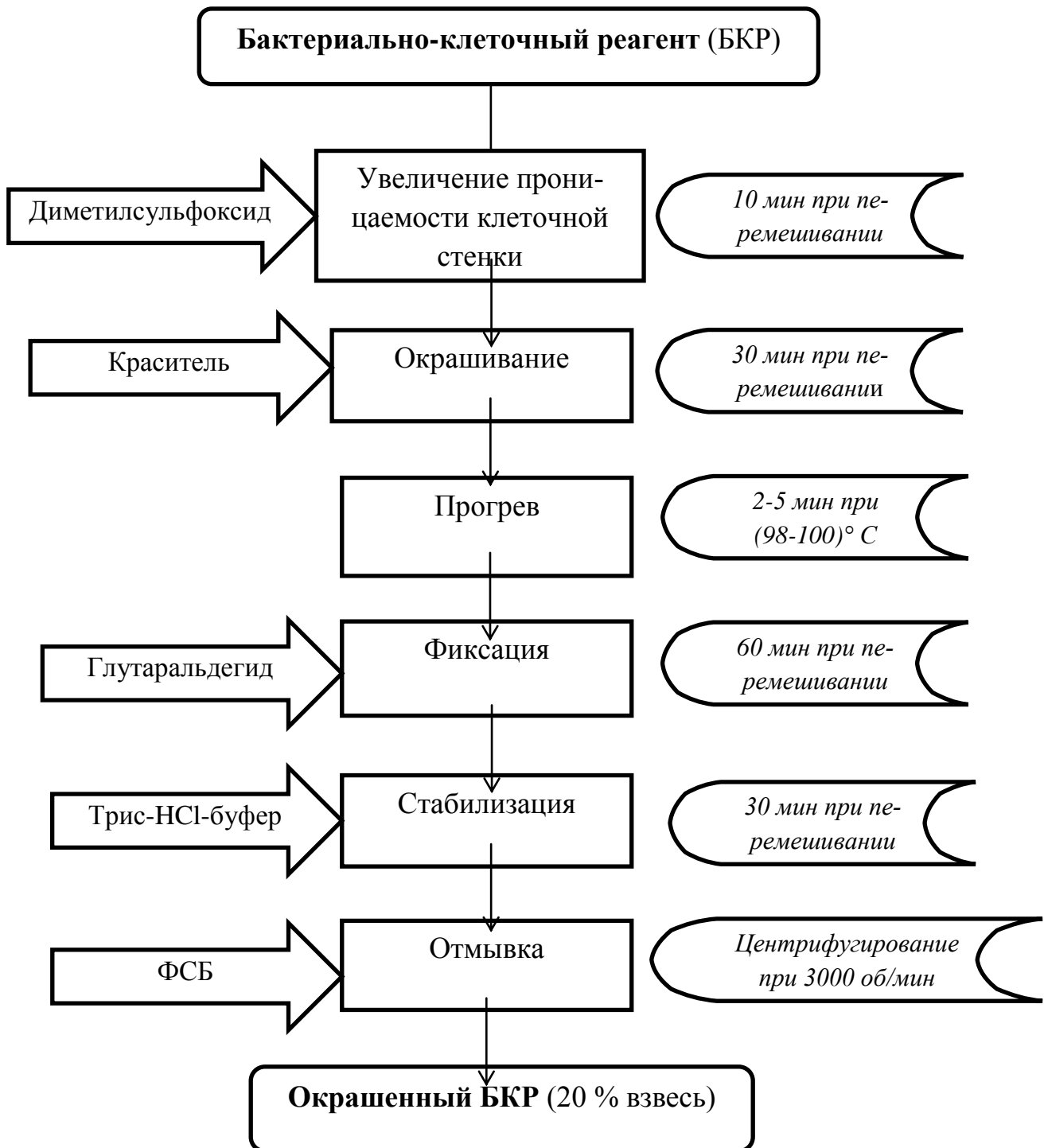


Рис. 8. Схема приготовления окрашенного бактериально-клеточного реагента

Полученные суспензии окрашенных клеток контролировали на гомогенность и активность в РБИК, а также оценивали интенсивность окрашивания стафилококковой суспензии по трехкrestной системе. Результаты анализа представлены в таблице 9.

В экспериментах с бромтимоловым синим, нигрозином, фуксином основным, малахитовым зеленым, хризоидином не удалось получить интенсивного окрашивания агглютинатов РБИК. При использовании же в качестве красящих агентов кристаллического фиолетового, эозина, метилового оранжевого и метилвиолета наблюдалась спонтанная агглютинация стафилококковых клеток.

В ходе выполнения эксперимента было показано, что наибольшая степень окрашивания бактериальной суспензии при сохранении ее гомогенности достигалась при использовании 1 % раствора метиленового синего, 1 % сафранина и 2% бриллиантового зеленого. При отстаивании суспензии расслаивались на интенсивно окрашенный осадок клеток и слабо окрашенную прозрачную надосадочную жидкость. В контролях на гомогенность полученные окрашенные суспензии были равномерно мутными, стафилококковые клетки не образовывали визуально различимых конгломератов. В РБИК при положительном результате наблюдали четкое выявление окрашенных агглютинатов на бесцветном, прозрачном фоне капли. При меньших концентрациях красителя, несмотря на достаточную интенсивность окрашивания осадка клеток, в РБИК эффект окрашивания проявлялся слабо.

Следующим этапом наших исследований была разработка специфических диагностикумов на основе окрашенного БКР.

4.2. Конструирование специфических диагностикумов на основе БКР: отработка условий сенсibilизации БКР кроличьими антителами, приготовление окрашенных диагностикумов для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов

Нами была проведена отработка условий приготовления специфических диагностических реагентов (диагностикумов), а также их оценка и стандартизация.

Подбор оптимальных концентраций антител для сенсibilизации суспензии стафилококка производился при использовании доз от 0,2 до 2,0 мг белка на 1 мл 10% суспензии при стандартных условиях эксперимента: смесь выдерживали в течение 30 минут при комнатной температуре, постоянно перемешивая. Сенсibilизированные клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость, содержащую несвязавшиеся антитела, удаляли, осадок однократно промывали в ФСБ и ресуспендировали в том же растворе до получения 2% суспензии, которую использовали в качестве специфического реагента в РКОА.

Как следует из данных таблицы 10, при высокой сенсibilизирующей дозе антител – 1,5-2,0 мг белка на 1 мл суспензии, диагностикумы давали спонтанную неспецифическую агглютинацию. При сенсibilизирующей дозе менее 1,5 мг белка на 1 мл 10 % суспензии реакция, как правило, была четкой, агглютинаты в капле формировались быстро, спонтанной агглютинации диагностикумов не наблюдалось.

	2,0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
1,5	0,2	+++	+	-	-	-	-	-	-
	0,4	++++	+++	+	-	-	-	-	-
	0,6	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
	0,8	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
	1,0	++++	++++	++++	++++	++	+	-	-
	1,2	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	+
	1,4	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
	1,6	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+
	1,8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
	2,0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+

Примечание: * - для дифтерийных и коклюшных антител получены аналогичные результаты.

Важно отметить, что для приготовления высокочувствительных реагентов пригодны антитела с разным содержанием белка (до 0,5 мг/мл). Нами показано также, что при использовании для сенсibilизации разных порций антител с различным содержанием белка могут быть получены диагностикумы со сходной чувствительностью при условии выравнивания препаратов антител по белку (табл. 10).

Полученные данные позволили нам приготовить диагностикумы на основе окрашенного БКР и кроличьих антител к дифтерийному, столбнячному и коклюшным антигенам. Разработанные диагностикумы для проведения РКОА представляют собой аффинноочищенные антитела кролика к дифтерийному, столбнячному и коклюшным антигенам, фиксированные на белке А стафилококка штамма Cowan I (рис. 9). При этом антительная молекула соединяется с поверхностным белком А через Fc-фрагмент, а Fab-фрагменты остаются свободными, приобретая пространственную ориентацию, благоприятную для связывания гомологичного антигена (рис. 10).

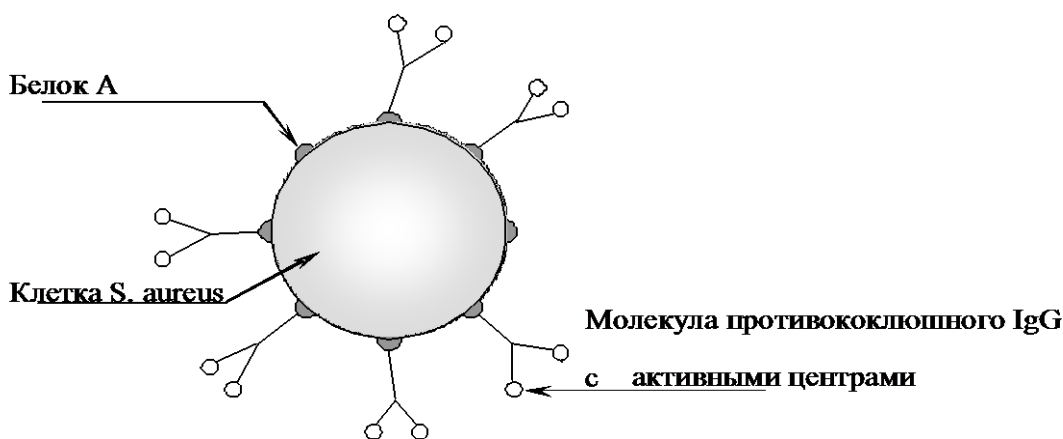


Рис. 9. Схема строения диагностикума

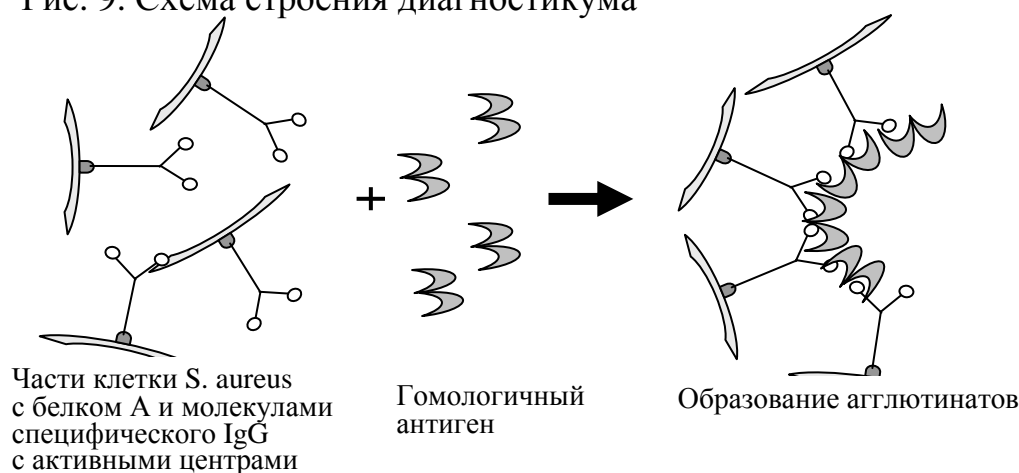


Рис. 10. Схема реакции коаггутинации

Полученные нами диагностикумы обладали гомогенностью и не давали спонтанной агглютинации. При взаимодействии с гомологичными антигенами в реакции коаггутинации наблюдалось быстрое формирование агглютинатов. Для контроля специфичности диагностикумов использовали контрольные положительные образцы дифтерийного и столбнячного анатоксинов в разведении 1 Lf/мл. Диагностикумы выявляли гомологичные антигены и не давали перекрестных реакций с гетерологичными антигенами, что свидетельствовало о специфичности метода. При определении чувствительности РКОА показано, что минимально выявляемая концентрация для дифтерийного и столбнячного анатоксинов составляла 0,03-0,06 Lf/мл (табл. 11).

При определении специфичности и чувствительности коклюшного диагностикума мы столкнулись с проблемой отсутствия единых единиц активности для коклюшной суспензии и бесклеточной антигенной фракции *B. pertussis* (КАГ). Для этого нами были введены условные коаггутинационные единицы (КЕ), соответствующие содержанию МЕ в коклюшной суспензии. При параллельном титровании ее в РКОА было рассчитано содержание КЕ в КАГ. Таким образом, было определено, что минимально выявляемая концентрация коклюшных антигенов - 0,6 КЕ (табл. 12).

Таблица 12

Определение содержания условных коаггутинационных единиц (КЕ)

Серия КС	Разведение коклюшной суспензии, МЕ/мл							
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,1563
52	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-
61	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-
62	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-
63	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-
Серия КАГ	Разведение КАГ							
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
15	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-
16	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-
19	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-
20	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-
КЕ/мл	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,1563

При изучении длительности хранения установлено, что стабильность диагностикумов в жидком виде сохраняется в течение 3-4 недель при температуре от 2 до 8 °С. Для увеличения срока хранения диагностикумы подвергали лиофильному высушиванию по технологии, отработанной для БКР, и герметизации. В качестве защитной среды для сублимационного высушивания применяли смесь сахарозы

(1 %) и пептона (3 %) в 0,01 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4±0,1), в качестве консерванта - мертиолят натрия 0,01 % или азид натрия 0,02 %.

Показано, что при лиофилизации не изменяются физико-химические и специфические свойства диагностикумов. Сухие препараты представляли собой пористую массу, которая практически мгновенно полностью ресуспендировалась в фосфатном буферном растворе (рН 7,4±0,1), взятом в исходном объеме, с образованием гомогенной взвеси. При нанесении капли реагента на предметное стекло гомогенность взвеси сохранялась при покачивании стекла в течение не менее 10 минут.

Чувствительность и специфическая активность регидратированных препаратов оценивалась при параллельном титровании антигенов в РКОА с исходными жидкими реагентами. Результаты исследований показали, что лиофилизированные препараты полностью сохраняли исходные свойства.

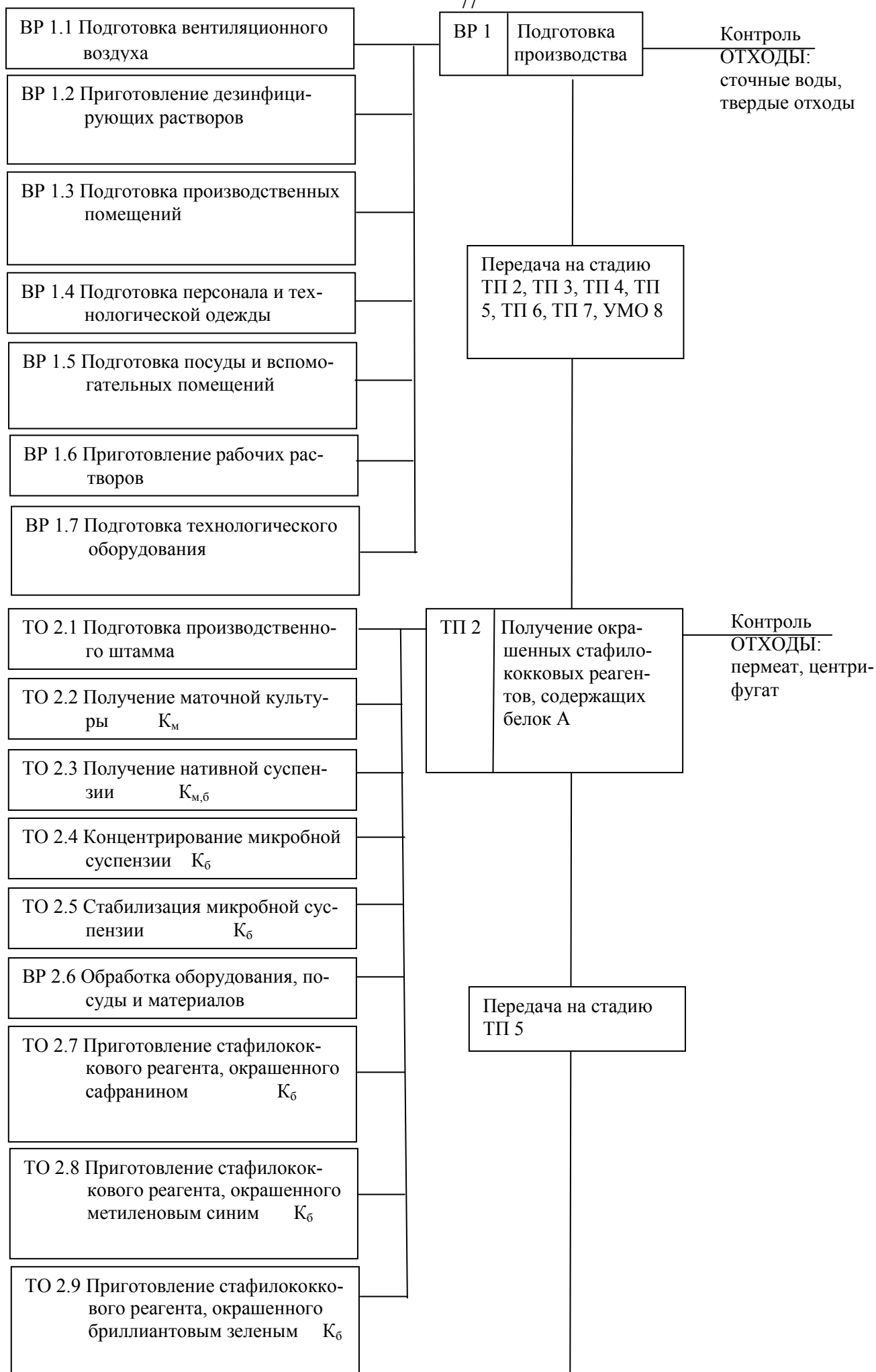
4.3. Комплектация тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации. Изучение стабильности тест-набора при хранении

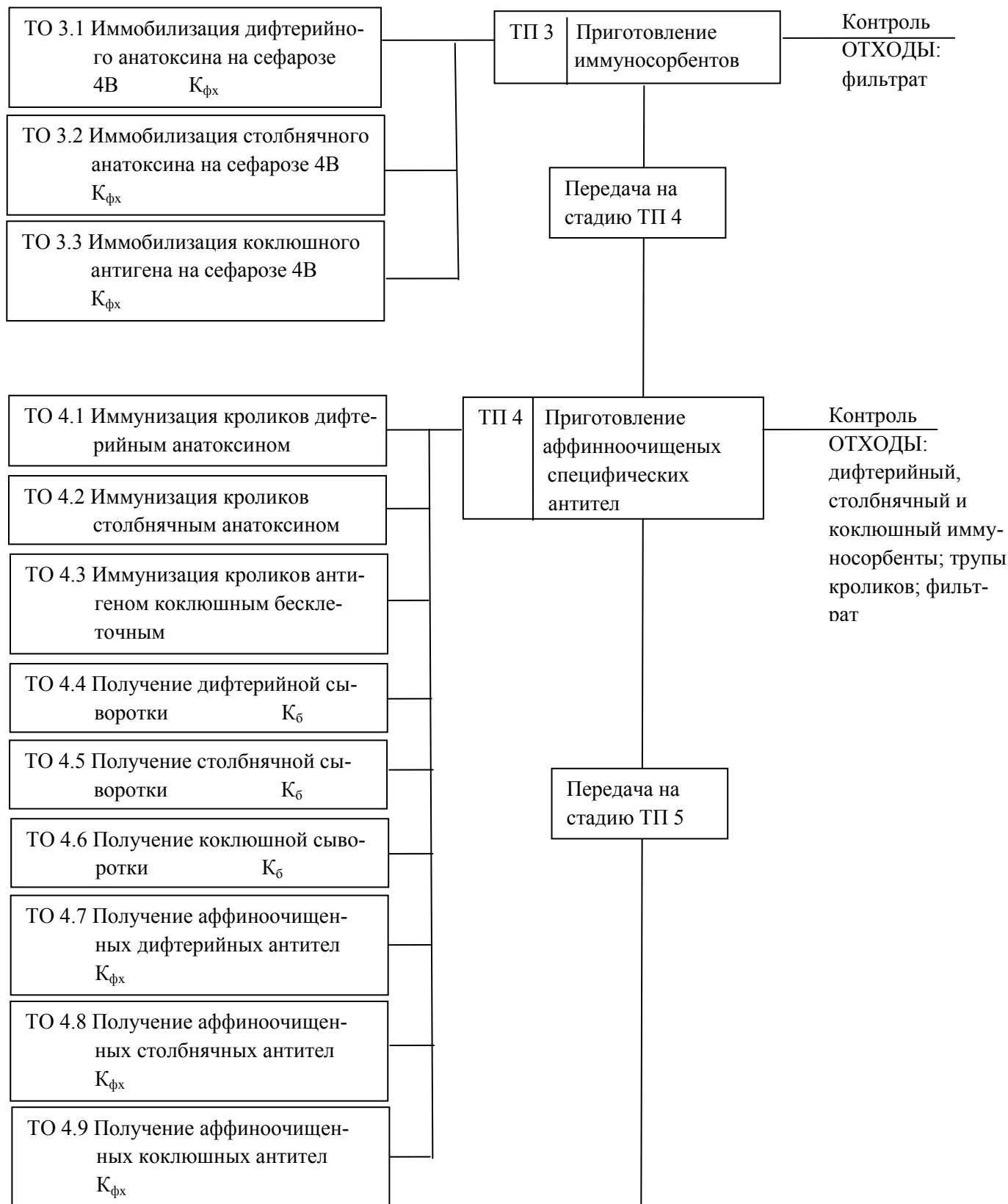
Итогом проведенных исследований явилась разработка тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА («ТН-ДСК-КОА»). Состав набора реагентов представлен в таблице 13. На разработанный тест-набор был составлен пакет документов, включающий инструкцию по применению, технические условия и промышленный регламент.

Полная технологическая схема производства набора реагентов «ТН-ДСК-КОА» представлена на рис. 11.

Изучение стабильности тест-набора при хранении

При определении срока годности набора реагентов определяли следующие показатели: внешний вид, растворимость, рН, микробиологическая чистота, потеря в массе при высушивании, подлинность, специфическая активность. Срок наблюдения составил 16 месяцев при температуре хранения от 2 до 8 °С. Было показано, что компоненты разработанного тест-набора сохраняют свою стабильность по всем показателям в пределах нормы при испытанном сроке годности (табл. 14).





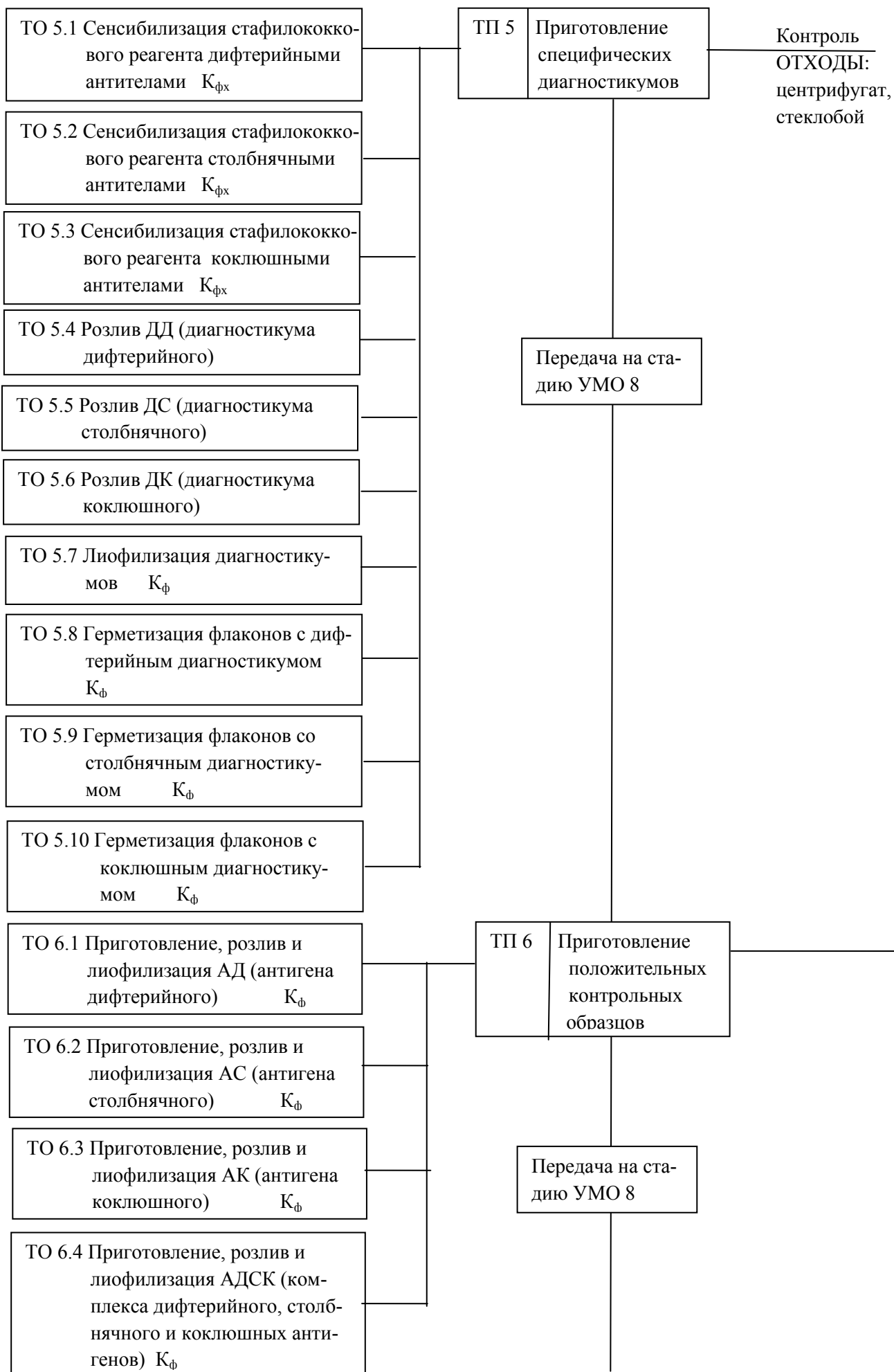




Рис. 11. Технологическая схема производства набора реагентов «ТН-ДСК-КОА».

Таблица 13

Комплектация тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА

Компонент	Сокращенное название	Состав
Диагностикум для определения дифтерийного антигена	ДД	Кроличьи аффинноочищенные антитела против дифтерийного анатоксина, сорбированные на белке А инактивированного стафилококка штамма Cowan I, окрашенного сафранином
Диагностикум для определения столбнячного антигена	ДС	Кроличьи аффинноочищенные антитела против столбнячного анатоксина, сорбированные на белке А инактивированного стафилококка штамма Cowan I, окрашенного метиленовым синим
Диагностикум для определения коклюшных антигенов	ДК	Кроличьи аффинноочищенные антитела против антигенов <i>B. pertussis</i> , сорбированные на белке А инактивированного стафилококка штамма Cowan I, окрашенного бриллиантовым зеленым
Контрольный положительный образец антигена дифтерийного	АД	Анатоксин столбнячный очищенный концентрированный, сухой
Контрольный положительный образец антигена столбнячного	АС	Анатоксин дифтерийный очищенный концентрированный, сухой
Контрольный положительный образец антигена коклюшного	АК	Антигенная фракция <i>B. pertussis</i> очищенная, сухая
Контрольный положительный образец для исследования адсорбированных препаратов	АДСК	Комплекс дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов, адсорбированный на геле гидроксида алюминия
Концентрат для приготовления буфера	ФСБ×25	Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора 25-кратный
Инструкция по применению		

Таблица стабильности набора реагентов «ТН-ДСК-КОА»

1	2		3	4	5	6	7
Определяемый показатель	Норма		Соответствие требованиям в процессе хранения				
Срок хранения, мес.			0	4	8	12	16
Внешний вид	ДД	аморфная масса или таблетка розово-красного цвета	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	ДС	аморфная масса или таблетка синего цвета	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	ДК	аморфная масса или таблетка зеленого цвета	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	АД	аморфная масса или таблетка белого цвета	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	АС	аморфная масса или таблетка белого цвета	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	АК	аморфная масса или таблетка белого цвета	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	АДСК	аморфная масса или таблетка белого цвета	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	ФСБ _{x25}	прозрачная бесцветная жидкость; при стоянии возможно выпадение кристаллического осадка солей, растворяющегося при температуре (37±1)°С в течение 5 мин	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Растворимость, мин.	ДД	(15±5) при t (20±2) °С	1	1	1	1	1
	ДС	(15±5) при t (20±2) °С	1	1	1	1	1
	ДК	(15±5) при t (20±2) °С	1	1	1	1	1
	АД	(15±5) при t (20±2) °С	1	1	1	1	1
	АС	(15±5) при t (20±2) °С	1	1	1	1	1
	АК	(15±5) при t (20±2) °С	1	1	1	1	1
	АДСК	(15±5) при t (20±2) °С	1	1	1	1	1
рН	ФСБ	7,3 ± 0,2	7,2	7,1	7,2	7,3	7,3
Микробиологическая чистота, количество колоний	ДД	не более 20 на чашку Петри	2	2	3	3	3
	ДС	не более 20 на чашку Петри	2	2	3	3	3
	ДК	не более 20 на чашку Петри	3	3	3	4	4
	АД	не более 20 на чашку Петри	2	2	3	3	3
	АС	не более 20 на чашку Петри	3	3	3	3	4

	АК	не более 20 на чашку Петри	2	3	3	3	3
	АДСК	не более 20 на чашку Петри	2	2	2	2	3
Потеря в массе при высушивании, %	ДД	не более 5	2,3	2,4	2,4	2,4	2,5
	ДС	не более 5	3,5	3,7	3,8	3,8	3,9
	ДК	не более 5	2,8	2,9	3,1	3,1	3,2
	АД	не более 5	2,6	2,7	2,7	2,8	2,9
	АС	не более 5	2,4	2,5	2,5	2,7	2,8
	АК	не более 5	3,0	3,0	3,1	3,3	3,3
	АДСК	не более 5	3,4	3,4	3,7	3,8	3,9
Подлинность	Тест-набор должен обеспечивать образование агглютинатов в реакции с гомологичным положительным контрольным образцом и сохранять гомогенность при добавлении отрицательного контрольного образца (ФСБ)		соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Специфическая активность	Тест-набор должен выявлять антигены с чувствительностью не ниже:						
	АД	0,06 Lf/мл	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	АС	0,06 Lf/мл	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	АК	0,6 KE/мл	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

4.4. Валидация тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации

Важной частью системы обеспечения и контроля качества тест-систем является валидация. Во всех нормативных документах по валидации аналитических методик [7, 8, 9] методологическая часть начинается с определения параметров валидации. Необходимость использования конкретного параметра валидации варьирует в зависимости от области применения метода [8]. Кроме того, каждая лаборатория сама определяет, какие параметры метода должны быть охарактеризованы с целью его валидации [133].

Нами были проведены исследования по определению чувствительности (предела обнаружения), прецизионности (сходимости и воспроизводимости) и специфичности разработанного тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации.

Предел количественного определения

Для выявления минимально определяемого количества специфических антигенов использовали последовательные двукратные разведения контрольных положительных образцов: АД – с 1,0 Lf/мл, АС – с 1,0 Lf/мл, АК – с 10,0 KE/мл. Образцы титровали в РКОА в 10 повторностях. Данные представлены в таблице 15.

Таблица 15

Предел обнаружения РКОА со специфическими антигенами

№ измерения	Чувствительность диагностикумов		
	ДД, Lf/мл	ДС, Lf/мл	ДК, KE/мл
1	0,03	0,06	0,3
2	0,06	0,06	0,3
3	0,03	0,06	0,6
4	0,03	0,06	0,6
5	0,06	0,03	0,6
6	0,06	0,06	0,3
7	0,06	0,03	0,6

8	0,03	0,03	0,6
9	0,06	0,06	0,3
10	0,03	0,06	0,6
Среднее геометрическое	0,04	0,05	0,45
Доверительный интервал	[0,03-0,06]	[0,03-0,06]	[0,30-0,61]

На основании полученных статистических данных установлено, что минимально определяемое количество специфических антигенов в реакции коаггуляции с использованием набора реагентов ТН-ДСК-КОА составляет $0,042 \pm 0,016$ Lf/мл для дифтерийного диагностикума, $0,049 \pm 0,014$ Lf/мл для столбнячного диагностикума и $0,455 \pm 0,155$ КЕ/мл для коклюшного диагностикума.

Прецизионность

Прецизионность методики отражает близость (степень разброса) результатов независимых измерений многократно взятых проб одного и того же однородного образца при конкретных регламентированных условиях: условиях повторяемости или условиях воспроизводимости. Повторяемость (сходимость) отражает прецизионность при одинаковых условиях анализа (один исполнитель, на одном оборудовании, с одним набором реагентов) в течение короткого промежутка времени, воспроизводимость отражает прецизионность при использовании методики в разных лабораториях и оценивается при межлабораторных испытаниях [1-6, 78, 80, 100].

Сходимость

Для определения сходимости результатов в реакции коаггуляции использовали последовательные двукратные разведения контрольных положительных образцов, входящих в состав тест-набора ТН-ДСК-КОА (АД – с 1,0 Lf/мл, АС – с 1,0 Lf/мл, АК – с 10,0 КЕ/мл).

В качестве исследуемых образцов использовали дифтерийный и столбнячный анатоксины производства НПО «Биомед» с титром (Lf/мл), определенным в реакции флокуляции, а также коклюшную суспензию производства НПО «Биомед» с известным значением КЕ/мл. Для постановки реакции готовили последовательные двукратные разведения образцов.

Для определения сходимости образцы титровали в РКОА в 10

повторностях. Данные оценки точности при измерении минимально определяемого количества специфических антигенов в контрольных и исследуемых образцах представлены в таблице 16.

Таблица 16

Точность РКОА со специфическими антигенами

	ДД		ДС		ДК	
	АД, Lf/мл	Аг*, Lf/мл	АС, Lf/мл	Аг*, Lf/мл	АК, КЕ/мл	Аг*, КЕ/мл
Среднее геометрическое	0,04	0,05	0,05	0,05	0,45	0,32
Доверительный интервал	[0,03- 0,06]	[0,04- 0,06]	[0,03- 0,06]	[0,04- 0,06]	[0,30- 0,61]	[0,25- 0,41]

Примечание: – * исследуемый антиген

Представленные данные подтверждают точность результатов в реакции коаггутинации со специфическими диагностикумами, так как полученные значения доверительных интервалов для контрольных образцов и исследованных антигенов перекрываются.

Воспроизводимость

Для установления воспроизводимости результатов реакции коаггутинации проводили совместные исследования в научно-исследовательской (НИЛ) и в производственной (ПЛ) лабораториях. При этом использовали последовательные двукратные разведения контрольных положительных образцов: АД – с 1,0 Lf/мл, АС – с 1,0 Lf/мл, АК – с 10,0 КЕ/мл. Образцы титровали в РКОА в 10 повторностях. Данные измерения минимально определяемого количества специфических антигенов в контрольных образцах представлены в таблице 17.

Таблица 17

Воспроизводимость РКОА со специфическими антигенами

	АД, Lf/мл		АС, Lf/мл		АК, КЕ/мл	
	НИЛ	ПЛ	НИЛ	ПЛ	НИЛ	ПЛ
Среднее геометрическое	0,04	0,05	0,05	0,04	0,45	0,50
Доверительный интервал	[0,03- 0,06]	[0,03- 0,06]	[0,03- 0,06]	[0,02- 0,06]	[0,30- 0,61]	[0,40- 0,65]

В межлабораторном эксперименте по титрованию контрольных положительных образцов в реакции коаггутинации подтверждена воспроизводимость полученных результатов, так как в параллельных сериях опытов показано, что границы доверительных интервалов перекрываются.

Специфичность

Специфичность методики - способность однозначно определять исследуемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце [78, 80].

Для контроля специфичности диагностикумов в реакции коаггутинации использовали рабочее разведение контрольных положительных образцов: АД – 1,0 Lf/мл, АС – 1,0 Lf/мл, АК – 10,0 KE/мл (табл. 18). При оценке специфичности образцы контролировали в РКОА в 10 повторностях.

Таблица 18

Специфичность РКОА с антигенами

Антигены	Диагностикумы		
	ДД	ДС	ДК
АД, Lf/мл	++++	отр.	отр.
АС, Lf/мл	отр.	++++	отр.
АК, KE/мл	отр.	отр.	++++

Из представленных данных видно, что диагностикумы обеспечивают образование агглютинатов в реакции с гомологичными положительными контрольными образцами и сохраняют гомогенность при добавлении гетерологичных контрольных образцов.

Таким образом, на основании полученных статистических данных установлено, что реакция коаггутинации с использованием окрашенных диагностикумов позволяет получать стабильные и точные результаты, обладает высокой специфичностью и достаточной чувствительностью.

Следующим этапом нашей работы стало определение области применения разработанного тест-набора.

4.5. Изучение возможности применения РКОА в производстве вакцинных препаратов

Нам представлялось интересным оценить возможность применения РКОА, как экспрессного метода, для оперативного слежения за целевым продуктом непосредственно в условиях биотехнологического производства.

В качестве модели нами был выбран процесс получения коклюшного компонента комбинированных вакцин. Производственный процесс изготовления бесклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцинных препаратов включает целый ряд самостоятельных этапов: получение исходной антигенной фракции, последующую очистку диафильтрацией от низкомолекулярных балластных примесей, дополнительную хроматографическую очистку от эндотоксинов, детоксикацию формальдегидом и последующую концентрацию антигенной фракции с использованием ультрафильтрации и переосаждения. Основным показателем для каждой из этих стадий является специфическая активность комплекса коклюшных антигенов, сохранение которой необходимо обеспечивать в динамике производственного процесса.

В производстве цельноклеточной коклюшной вакцины регламентированным методом оценки специфической активности готового препарата является биологический тест на мышах, на стадиях биотехнологического процесса используют метод «ин витро» - классическую реакцию агглютинации с контрольной (диагностической) сывороткой. Визуализация результатов такой реакции обеспечивается присутствием в реакционной смеси микробных клеток, за счет которых формируются агглютинаты. Для оценки бесклеточного коклюшного антигена применение реакции агглютинации с диагностической сывороткой невозможно. Поэтому разработка экспрессных методов «ин витро» в данном случае представляется целесообразной.

Нами была оценена возможность использования РКОА при определении антигенной фракции *B. pertussis* (КАГ) в процессе диафильтрации с целью очистки целевого продукта от низкомолекулярных балластных примесей. В качестве примера в таблице 19 приведены данные по использованию РКОА для слежения

за процессом диафильтрационной очистки субстанции бесклеточной коклюшной вакцины с. 34. Как видно из представленных данных, применение РКОА с коклюшным диагностикумом позволяет контролировать процесс дробной диафильтрационной очистки целевого продукта в условиях смены буферной системы.

Таблица 19

Контроль процесса диафильтрационной очистки антигенной фракции
с помощью РКОА

Цикл диафильтр. очистки	Раствор для диафильтрации	Результаты РКОА								
		Разведения антигенной фракции					Разведения фильтрата			
		1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4056	цел	1:2	1:4	1:8
Исходная антигенная фракция (центрифугат)		+++	+++	++	-	-				
1	H ₂ O очищ	+++	+++	++	-	-	++++	+++	+	-
2	H ₂ O очищ	+++	+++	++	+	-	++	++	++	-
3	H ₂ O очищ	+++	+++	++	-	-	+++	-	-	-
4	H ₂ O очищ	+++	+++	++	-	-	+++	++	+	-
5	H ₂ O очищ	++++	+++	+++	++	+	++	+	-	-
6	*СББ	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
7	СББ	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
8	СББ	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
9	СББ	++++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
10	СББ+NaCl	++++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
11	СББ+NaCl	++++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
12	СББ+NaCl	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-

Примечание: СББ – сукцинатно-боратный буферный раствор;

* - двукратное концентрирование.

Благодаря экспрессности РКОА, возможно слежение за антигенной фракцией *B. pertussis* в режиме «онлайн» и на всех последующих стадиях технологического процесса получения бесклеточной коклюшной вакцины (табл. 20).

Определение содержания комплекса коклюшных антигенов
в целевом продукте с помощью РКОА

Серия	Исследованный материал	Разведения исследованного материала					
		1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4056
30	КАГ после диафильтрации	++++	++++	++++	++++	+++	+
	КАГ после хроматографической очистки	++++	+++	+++	+	-	-
	КАГ после концентрирования	++++	++++	++++	+++	+++	+
	КАГ после обезвреживания формальдегидом	++++	++++	++++	+++	+++	+
31	КАГ после диафильтрации	++++	++++	++++	++++	+++	++
	КАГ после хроматографической очистки	++++	++++	+++	++	+	-
	КАГ после концентрирования	++++	++++	++++	+++	+++	++
	КАГ после обезвреживания формальдегидом	++++	++++	++++	+++	+++	++
32	КАГ после диафильтрации	++++	++++	++++	++++	+++	++
	КАГ после хроматографической очистки	++++	++++	+++	+	+	-
	КАГ после концентрирования	++++	++++	++++	++++	+++	+
	КАГ после обезвреживания формальдегидом	++++	++++	++++	++++	+++	+
33	КАГ после диафильтрации	++++	++++	++++	++++	+++	++
	КАГ после хроматографической очистки	++++	+++	+++	+	+	-
	КАГ после концентрирования	++++	++++	++++	+++	+++	+
	КАГ после обезвреживания формальдегидом	++++	++++	++++	+++	+++	+
	КАГ после переосаждения	++++	++++	++++	+++	++	+
34	КАГ после диафильтрации	++++	++++	++++	++++	+++	+
	КАГ после хроматографической очистки	++++	+++	++	+	-	-
	КАГ после концентрирования	++++	++++	++++	++++	+++	++

	КАГ после обезвреживания формальдегидом	++++	++++	++++	++++	+++	++
	КАГ после пересаживания	++++	++++	++++	+++	++	+
35	КАГ после диафильтрации	++++	++++	++++	++++	+++	++
	КАГ после хроматографической очистки	++++	+++	++	-	-	-
	КАГ после концентрирования	++++	++++	++++	++++	+++	+
	КАГ после обезвреживания формальдегидом	++++	++++	++++	++++	+++	+
	КАГ после пересаживания	++++	++++	++++	++++	+++	+
36	КАГ после диафильтрации	++++	++++	++++	++++	+++	++
	КАГ после хроматографической очистки	++++	+++	++	-	-	-
	КАГ после концентрирования	++++	++++	++++	++++	+++	+
	КАГ после обезвреживания формальдегидом	++++	++++	++++	++++	+++	+
	КАГ после пересаживания	++++	++++	++++	++++	+++	++

Таким образом, использование РКОА для контроля специфической активности при получении бесклеточной коклюшной вакцины позволяет оперативно получать результаты, что обеспечивает возможность экстренной коррекции технологического процесса.

Изучение возможности применения РКОА в производстве столбнячного анатоксина

При существующей в настоящее время практике токсические и антигенные свойства столбнячных токсинов-анатоксинов исследуют «in vivo» по биопробе на белых мышах. Нами была продемонстрирована возможность оперативного слежения за процессом накопления столбнячного токсина при помощи РКОА.

При культивировании в реакторе *Cl. tetani* были отобраны пробы на 2-е, 4-е и 7-е сутки роста культуры. Тестирование на наличие токсина проводили после фильтрации проб через бумажный фильтр для отделения крупных частиц среды

Китта-Тароцци. В данном случае оценку токсина проводили по упрощенному показателю, т.е. по разведению исследуемого материала. Зная чувствительность столбнячного диагностикума, установленную по предварительно оттитрованному контрольному токсину, путем пересчета можно определить ориентировочно специфическую (антигенную) активность исследуемого токсина в L+. Параллельно токсинсодержащий материал исследовали и в биопробе на мышах (результаты предоставлены отделением вакцинных препаратов филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед»). Результаты определения токсина в пробах из реактора приведены на рисунке 12.

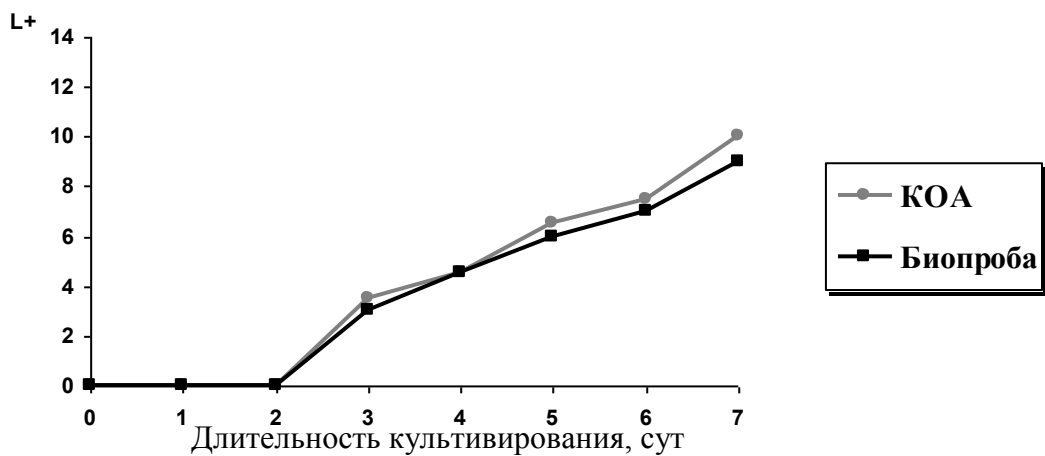


Рис. 12. Динамика токсинообразования *Cl. tetani* в промышленном реакторе

Из представленных графиков видно, что РКОА позволяла отчетливо зафиксировать динамику токсинообразования *Cl. tetani* в промышленном реакторе, даже просто в двукратных разведениях. Результаты определения антигенной активности в РКОА и на мышах были достаточно близки. Причем следует отметить, что результат, полученный *in vivo*, «запаздывал» на 4 суток.

В настоящее время взамен традиционных методов очистки и концентрации токсинов и анатоксинов путем высаливания нейтральными солями, изоэлектрического осаждения кислотами, осаждения спиртом, ацетоном, которые ведут к значительным потерям целевого продукта, интенсивно применяются щадящие высокопроизводительные и технически более совершенные методы очистки и концентрирования, основанные на процессах хроматографии, избирательной сорбции, мембранной ультрафильтрации.

Отечественной промышленностью освоен выпуск большого набора мембран и специального оборудования, что позволяет использовать хроматографические методы и ультрафильтрацию непосредственно в условиях производства. В Пермском НПО «Биомед» при производстве анатоксинов широко применяется метод ультрафильтрации. Этот способ очистки и концентрирования может проводиться в непрерывном режиме и завершается в течение 1 суток. Очевидно, что биологический метод титрования оказывается в этом случае малоинформативным, так как результаты не могут быть получены ранее, чем через 4 дня, в связи с чем коррекция технологического процесса становится невозможной.

Наши наблюдения показали возможность использования РКОА на стадии очистки и концентрирования токсинов в качестве экспрессного теста, для выполнения которого требуется минимум времени (табл. 21).

Таблица 21

Результаты использования РКОА и биологического метода при концентрировании столбнячного токсина методом ультрафильтрации

№ серии препарата	№ пробы	Концентраты	
		Титр РКОА	Активность в биопробе (L+) на 4-е сутки
75	1	1:640	20
78	1	1:640	20
	2	1:1280	25

Исключительная экспрессность реакции коаггутинации со специфическим диагностикумом позволяла оперативно корректировать условия технологического процесса с целью снижения потерь целевого продукта.

РКОА может быть использована как предварительный метод оценки очищенных анатоксинов на заключительном этапе производства.

При определении специфической активности анатоксинов использовали так называемый «тормозной» вариант РКОА, при котором в реакционную среду вводили определенную дозу (в МЕ) стандартной противостолбнячной сыворотки. В этом варианте РКОА было исследовано 10 серий анатоксинов.

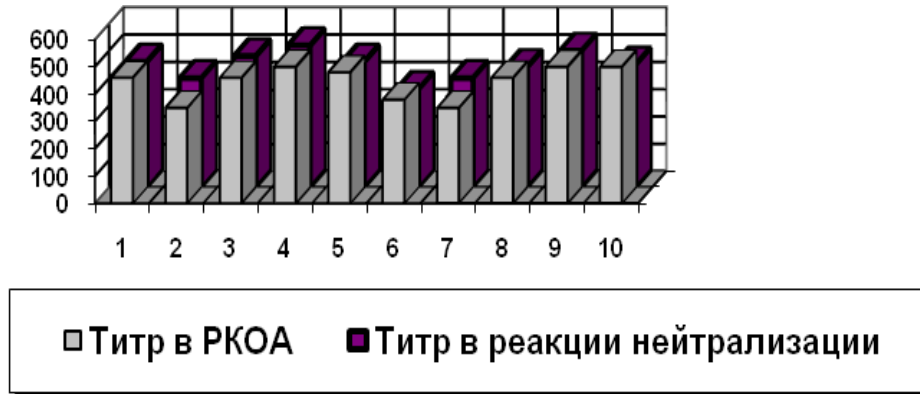


Рис. 13. Определение специфической активности столбнячных анатоксинов в РКОА и в реакции нейтрализации на мышах

Результаты определений, представленные в виде диаграммы (рис. 13), свидетельствуют о хорошей согласованности РКОА с биологическим тестированием.

Изучение возможности применения РКОА для контроля вакцинных препаратов по показателю «Полнота сорбции»

На следующем этапе работы в реакции коаггутинации с разработанными диагностикумами нами были исследованы моно- и комбинированные препараты по показателю «Полнота сорбции».

Чувствительность РКОА гарантирует выявление неадсорбированных анатоксинов, содержание которых по нормативной документации (ФСП) должно быть для дифтерийного – не более 1 Лf/мл, для столбнячного – не более 0,1 ЕС/мл в надосадочной жидкости. Определение содержания антигенов проводили в сравнении с аналогичными контрольными образцами по следующей формуле:

$$Y = X \times Z, \text{ где}$$

Y - содержание определяемого компонента;

X – знаменатель последнего двукратного разведения исследуемого материала, в котором наблюдалась положительная реакция не менее чем на «три креста» (+++);

Z – показатель чувствительности диагностикума.

С помощью РКОА была подтверждена полнота сорбции антигенов непосредственно в процессе производства при получении 53 серии сорбированных вакцин (АДС-М, АД-М, АС, АКДС, АКДС-Геп В, аАКДС, аАКДС-Геп В) (табл. 22). Компоненты вакцин выявляли в надосадочной жидкости после центрифугирования при 10 тыс. оборотов в минуту в течение 10 минут.

Особо следует отметить, что применение РКОА позволяет оценивать полноту сорбции бесклеточного коклюшного компонента. Установив содержание КЕ в вакцинной дозе бесклеточного коклюшного компонента, мы смогли определить предельную его концентрацию в надосадочной жидкости комбинированных вакцинных препаратов, которая, согласно Общей фармакопейной статье на анатоксины и вакцины, должна составлять не более 1 % от вакцинной дозы, если в частной фармакопейной статье нет других указаний. Так, учитывая требования нормативной документации, а также особен-

ности учета результатов РКОА, нами было показано, что максимально допустимое количество неадсорбированной антигенной фракции *B. pertussis* в надосадочной жидкости вакцинных препаратов составляет 1,25 КЕ/мл.

Таблица 22

Оценка полноты сорбции комбинированных вакцин
в реакции коаггутинации

Наименование препарата	№ серии	Результаты титрования надосадочной жидкости		
		Дифтерийный компонент, Лf/мл	Столбнячный компонент, Лf /мл	Коклюшный компонент, КЕ/мл
АДС-М	4	0	0,03	-
	208	0	0	-
	209	0	0	-
	210	0	0,06	-
	211	0	0	-
	212	0	0	-
	213	0	0	-
	214	0	0,06	-
	215	0	0	-
	216	0	0	-
	217	0	0	-
АКДС	3	0	0	0
	5	0	0	0
	7	0	0,03	0
	9	0	0	0
	10	0	0	0
	6	0	0	0
	8	0	0	0
	13	0	0,03	0
	14	0	0	0
	15	0	0	0
	16	0	0	0
	17	0	0	0

АКДС-ГепВ	6	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	0	0	0
	10	0	0	0
	11	0	0	0
	12	0	0,03	0
	13	0	0	0
	14	0	0	0
	15	0	0	0
АД-М	48	0	-	-
	53	0	-	-
АС	23	-	0	-
	27	-	0,03	-
	2	-	0	-
АаКДС	1	0,125	0,03	1,25
	2	0,0625	0	1,25
	3	0,0625	0	1,25
	4	0,0625	0	2,5
	10	0,125	0	1,25
	11	0,125	0	1,25
	15	0,125	0,03	1,25
	16	0,0625	0	0,625
	18	0,0625	0	1,25
АаКДС-Геп В	1	0,125	0	0,625
	2	0,125	0	0,625
	3	0,125	0	0,625
	4	0,125	0	0,625
	5	0,125	0	0,625
	6	0,125	0	0,625

Таким образом, данная реакция оказалась достаточно информативным методом при оценке полноты сорбции антигенов на геле гидроксида алюминия. Также РКОА информативна и удобна для проверки возможной десорб-

ции анатоксинов в динамике хранения препарата в течение срока годности. Мы имеем основание утверждать, что в этом случае ни один другой метод не может дать такой всесторонней количественной и качественной информации так же быстро, четко и оперативно, как РКОА.

Изучение возможности применения РКОА для контроля вакцинных препаратов по показателю «Подлинность»

Далее мы показали возможность использования разработанного набора реагентов «ТН-ДСК-КОА» для анализа готовых вакцинных препаратов по показателю подлинности. В эксперименте были исследованы как отечественные вакцины, так и зарубежные, а также экспериментальные серии разрабатываемых в Пермском НПО "Биомед" комбинированных препаратов с бесклеточным коклюшным компонентом (АаКДС, АаКДС-Геп В). Одновременно была проведена оценка подлинности субстанций, входящих в состав комбинированных вакцин (очищенных концентрированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов, коклюшной инактивированной суспензии, а также вакцины коклюшной бесклеточной очищенной).

В этих опытах в качестве контроля для сорбированных препаратов применяли АДСК, для несорбированных – АД, АС и АК. Адсорбированные вакцины и АДСК предварительно десорбировали. Для этого готовили десорбирующий буферный раствор с рН $8,7 \pm 0,1$, для чего 1,0 мл 0,2 М раствора соли динатриевой этилендиамина-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты 2-водной доводили до 50 мл 0,6 М раствором натрия фосфорнокислого двузамещенного. Для оценки испытуемых адсорбированных вакцин 2,0 мл исследуемого препарата предварительно центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин, удаляли надосадочную жидкость и к полученному осадку добавляли 700 мкл десорбирующего фосфатного буферного раствора. Одновременно лиофилизированный контрольный положительный образец АДСК растворяли в 700 мкл десорбирующего фосфатного буферного раствора. После этого все образцы инкубировали при 37 °С в течение 1 ч.

Затем добавляли 1300 мкл ФСБ и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Для анализа использовали десорбат (надосадочную жидкость после последнего центрифугирования).

При оценке подлинности готовили в трех повторностях разведение контрольных положительных образцов, несорбированных вакцинных препаратов либо десорбатов адсорбированных вакцин 1:2, субстанций – 1:10. Достоверность результатов РКОА должна подтверждаться отрицательными контролями: на специфичность (диагностикум с гетерологичными вакцинными препаратами) и спонтанную агглютинацию (диагностикум с фосфатным буферным раствором). Результат теста признавали положительным (подтверждение наличия столбнячных, дифтерийных или коклюшных антигенов), если выявлялась хорошо выраженная коаггутинация в исследуемых и контрольных положительных образцах: реакция не менее чем на «три креста» (+++) при сохранении гомогенности в отрицательных контролях. Данные, полученные при оценке подлинности вакцинных препаратов, представлены в таблицах 23 и 24.

Таблица 23

Оценка адсорбированных препаратов по показателю «Подлинность» в реакции коаггутинации

Образец	Кол-во серий	№ измерения	Диагностикум		
			ДД	ДС	ДК
Положительный контроль АДСК		1	++++	++++	++++
		2	++++	++++	++++
		3	++++	++++	++++
Отрицательный контроль (ФСБ)		1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
АКДС	15	1	++++	++++	++++
		2	++++	++++	++++
		3	++++	++++	++++

АКДС-геп В	15	1	++++	++++	++++
		2	++++	++++	++++
		3	++++	++++	++++
аАКДС	9	1	++++	++++	++++
		2	++++	++++	++++
		3	++++	++++	++++
аАКДС-Геп В	6	1	++++	++++	++++
		2	++++	++++	++++
		3	++++	++++	++++
Вакцина Инфанрикс	3	1	++++	++++	++++
		2	++++	++++	++++
		3	++++	++++	++++
Вакцина Инфанрикс Гекса	1	1	++++	++++	++++
		2	++++	++++	++++
		3	++++	++++	++++
Вакцина Тетраксим	1	1	++++	++++	+++
		2	++++	++++	+++
		3	++++	++++	++++
Вакцина Пентаксим	3	1	++++	++++	+++
		2	++++	++++	+++
		3	++++	++++	++++
АДС-М-анатоксин	14	1	++++	++++	-
		2	++++	++++	-
		3	++++	++++	-
АС-анатоксин	5	1	-	++++	-
		2	-	++++	-
		3	-	++++	-
АД-М-анатоксин	5	1	++++	-	-
		2	++++	-	-
		3	++++	-	-
Вакцина Хаврикс	3	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
Вакцина Энджерикс В	3	1	-	-	-

		2	-	-	-
		3	-	-	-
Вакцина гепатита В рекомбинантная, ЗАО «Комбиотех»	3	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-

Таблица 24

Оценка препаратов без предварительной десорбции по показателю
«Подлинность» в реакции коаггутинации

Образец	Кол-во серий	№ измерения	Диагностикум		
			ДД	ДС	ДК
Положительный контроль АД		1	++++	-	-
		2	++++	-	-
		3	++++	-	-
Положительный контроль АС		1	-	++++	-
		2	-	++++	-
		3	-	++++	-
Положительный контроль АК		1	-	-	++++
		2	-	-	++++
		3	-	-	++++
Отрицательный контроль (ФСБ)		1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
Очищенный концентрированный дифтерийный анатоксин (ОКДА)	20	1	++++	-	-
		2	++++	-	-
		3	++++	-	-
Очищенный концентрированный столбнячный анатоксин (ОКСА)	20	1	-	++++	-
		2	-	++++	-
		3	-	++++	-
Коклюшная суспензия инактивированная, субстанция (КС)	10	1	-	-	++++
		2	-	-	++++
		3	-	-	++++

Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная, субстанция (БКВ)	27	1	-	-	++++
		2	-	-	++++
		3	-	-	++++
АКТ-ХИБ, Франция	3	1	-	++++	-
		2	-	++++	-
		3	-	++++	-
Хиберикс, Бельгия	3	1	-	++++	-
		2	-	++++	-
		3	-	++++	-
ХИБ-вакцина, Индия	3	1	-	++++	-
		2	-	++++	-
		3	-	++++	-
Quimi-Hib, Куба	3	1	-	++++	-
		2	-	++++	-
		3	-	++++	-
Вакцина Гриппол	3	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
Вакцина против краснухи	3	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-

В результате проведенных испытаний было показано, что набор реагентов «ТН-ДСК-КОА» позволяет достоверно определять подлинность дифтерийного, столбнячного и коклюшного компонентов в составе всех исследованных препаратов. Так, при постановке РКОА с комбинированными вакцинами, содержащими все три компонента (АКДС, АКДС-Геп В, аАКДС, аАКДС-Геп В, Инфанрикс, Инфанрикс Гекса, Тетраксим, Пентаксим), наблюдалась четкая положительная реакция с дифтерийным, столбнячным и коклюшным диагностикумами. При этом вакцинные препараты, содержащие 1 или 2 антигена, взаимодействовали только с гомологичными диагностикумами, в опыте же с гетерологичным диагностикумом неспецифическая реакция отсутствовала (сохранялась гомогенность образца).

По требованиям Европейской Фармакопеи [134], в конъюгированных вакцинах для определения подлинности необходимо идентифицировать белок-носитель, в частности столбнячный анатоксин. Разработанный столбнячный диагностикум позволяет подтвердить в РКОА наличие столбнячного анатоксина в составе конъюгированных вакцин и компонентов вакцин (АКТ-ХИБ, Хиберикс, ХИБ-вакцина, Quimi-Hib).

Была доказана возможность использования РКОА для оценки по показателю «Подлинность» субстанций, которые используются для получения адсорбированных комбинированных вакцин: наблюдалась положительная реакция ДД с ОКДА, ДС с ОКСА, ДК с КС и БКВ (табл. 24).

Следует отметить, что нами была подтверждена специфичность тест-набора: дифтерийный, столбнячный и коклюшный диагностикумы сохраняли гомогенность в реакции с вакцинами Хаврикс, Энджерикс В, Гриппол, вакцины гепатита В рекомбинантной, вакцины против краснухи.

Изучение возможности применения РКОА для ориентировочного определения содержания антигенов

Далее нами была исследована возможность использования РКОА как полуколичественного метода для ориентировочного определения содержания антигенов в образцах субстанций (табл. 25), десорбатах вакцинных препаратов (табл. 26), а также для оценки белка-носителя в конъюгированных вакцинах (табл. 27). Следует отметить, несмотря на то, что десорбция может проходить не в полной мере, РКОА позволяет получать результаты, сопоставимые с реальным содержанием компонентов в составе вакцинных препаратов.

Результаты оценки очищенных концентрированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов в РКОА

Анатоксин	Се- рия	Титр по РФ, Lf/мл	Результаты РКОА								Титр по РКОА, Lf/мл
			Разведение анатоксина								
			1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384		
ОКДА	86	750	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	983
	113	450	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	-	492
	114	550	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	492
	115	650	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	983
	116	700	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	983
	117	550	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492
	132	850	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	983
	133	700	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	983
	134	650	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	983
	136	700	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	983
	137	700	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	983
ОКСА	860	460	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492
	871	500	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	492
	877	540	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	492
	878	440	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492
	857	500	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	492
	906	500	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	492
	912	320	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492
	915	360	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492
	916	380	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492
	917	360	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492
	936	220	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	246
	937	300	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	246
	938	400	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492
940	420	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	492	

Таблица 26

Результаты определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных
антигенов в десорбатах вакцинных препаратов

Вакцина	Серия	Диагно- стикум	Результаты РКОА							
			Разведение десорбата							Титр по РКОА, Lf/мл (КЕ/мл)
			1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
АКДС	21	ДД	++++	++++	++++	++++	+++	+	-	30,7
		ДС	++++	++++	+++	++	+	-	-	7,7
		ДК	++++	+++	+	-	-	-	-	38,4
	20	ДД	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	30,7
		ДС	++++	++++	+++	++	+	-	-	7,7
		ДК	++++	+++	+	-	-	-	-	38,4
АКДС-ГепВ	8	ДД	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	30,7
		ДС	++++	++++	+++	++	+	-	-	7,7
		ДК	++++	+++	+	-	-	-	-	38,4
АДСМ	10	ДД	++++	++++	+++	++	+	-	-	7,7
		ДС	++++	+++	+++	+	-	-	-	7,7
		ДК	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	ДД	++++	++++	+++	+	+	-	-	7,7
		ДС	++++	++++	+++	-	-	-	-	7,7
		ДК	-	-	-	-	-	-	-	-
Инфанрикс	180507	ДД	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	30,7
	11	ДС	+++	++++	+++	+++	+	-	-	15,3
		ДК	+++	++	-	-	-	-	-	19,2
Пентаксим	Н2240- 1	ДД	++++	++++	++++	++++	+++	+++	-	61,4
		ДС	+++	++++	++++	+++	+	-	-	15,3
		ДК	+	+	-	-	-	-	-	9,6
АС	38	ДД	-	-	-	-	-	-	-	-
		ДС	++++	++++	++++	+++	+	-	-	15,4
		ДК	-	-	-	-	-	-	-	-
АС	40	ДД	-	-	-	-	-	-	-	-
		ДС	++++	++++	++++	+++	+	-	-	15,4
		ДК	-	-	-	-	-	-	-	-
АДМ	58	ДД	++++	++++	+++	++	+	-	-	7,7

		ДС	-	-	-	-	-	-	-	-
		ДК	-	-	-	-	-	-	-	-
	58	ДД	++++	++++	+++	++	+	-	-	7,7
		ДС	-	-	-	-	-	-	-	-
		ДК	-	-	-	-	-	-	-	-
	59	ДД	++++	++++	+++	+	-	-	-	7,7
		ДС	-	-	-	-	-	-	-	-
		ДК	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 27

**Результаты определения столбнячного анатоксина (белка-носителя)
в составе конъюгированных вакцин и их компонентов**

Вакцина или компонент	Результаты РКОА						Содержание столбнячного анатоксина по РКОА, Lf/мл
	Разведение вакцины						
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
АКТ-ХИБ, Франция	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8
Хиберикс, Бельгия	++++	++++	++++	+++	-	-	2,4
ХИБ-вакцина, Индия	++++	++++	++++	+++	++	-	3,8
Quimi-Hib, Куба	++++	++++	++++	++++	+++	++	7,7

Таким образом, нами была показана возможность применения разработанного набора реагентов «ТН-ДСК-КОА» для контроля дифтерийного, столбнячного и коклюшного компонентов комбинированных вакцинных препаратов, а также для слежения за целевым продуктом на стадиях технологического процесса в условиях реального производства бесклеточной коклюшной вакцины и столбнячного анатоксина.

В филиале с участием ЗАО «Вымпел-Медцентр» были проведены технические и медицинские испытания разработанного тест-набора. По результатам тестирования набора были сделаны выводы, что аналитические характеристики данного тест-набора полностью соответствует требованиям ТУ, а функциональные и эксплуатационные качества соответствуют отечественным правилам и нормативам.

Также испытания набора реагентов «ТН-ДСК-КОА» были проведены в ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России. По результатам проведенного исследования сделано заключение, что разработанный тест-набор может быть использован для определения подлинности и полноты сорбции дифтерийного, столбнячного и коклюшных компонентов комбинированных вакцин в РКОА.

Метод контроля по показателям «Подлинность» и «Полнота сорбции» с применением разработанного набора «ТН-ДСК-КОА» в РКОА включен в проекты ФСП "Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина АКДС-Геп В+Hib)" и "Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина аАКДС-Геп В+Hib)".

ГЛАВА 5

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АВИДИН-БИОТИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУБСТАНЦИИ БЕСКЛЕТОЧНОЙ КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНЫ

Цельноклеточная коклюшная вакцина давно зарекомендовала себя как эффективное средство профилактики коклюша: она достаточно безопасна, защищает детей раннего возраста от тяжелых форм заболевания и летальных исходов [97]. Однако с целью бустерной вакцинации подростков и взрослых ВОЗ рекомендует использовать комбинированные вакцинные препараты с ацеллюлярным коклюшным компонентом [199].

На базе Пермского НПО «Биомед» ведутся исследования по созданию бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) и включению ее в состав комбинированных вакцинных препаратов. В связи с этим актуальной является разработка количественного метода определения специфической активности коклюшных антигенов и оценка возможности включения его в нормативную документацию на БКВ. Одним из таких количественных и высокочувствительных методов является иммуноферментный анализ.

Чувствительность и специфичность твердофазных иммуноферментных методов для определения антигенов в значительной степени зависит от качества входящих в комплект тест-систем ингредиентов. Разрабатываемая нами иммуноферментная тест-система для определения комплекса коклюшных антигенов основана на сэндвич-варианте ИФА, ее основными компонентами являются специфические антительные препараты, используемые для сорбции планшетов и получения конъюгатов на основе амплифицирующего комплекса авидин-биотин.

5.1. Разработка технологии получения ампфицированных конъюгатов на основе коклюшных аффинноочищенных антител кролика

Одним из важнейших моментов при конструировании иммуноферментной тест-системы для определения антигенов является выбор оптимальных реагентов для основных ее составляющих – конъюгатов [57].

Известно, что один из наиболее эффективных методов введения ферментной метки основан на использовании авидина и биотина, образующих между собой комплекс, характеризующийся константой связывания 10^{15} M^{-1} , что в десятки тысяч раз превышает характеристики связи антиген-антитело [32, 42, 88]. Ранее было показано, что использование комплекса авидин-биотин как при определении антигенов, так и антител, в значительной степени повышает специфичность и чувствительность анализа [32]. В связи с этим представлялось целесообразным провести исследования по получению биотинилированных антител кролика для определения комплекса коклюшных антигенов (КАГ).

При выполнении этого раздела работы за основу была взята методика, предлагаемая для биотинилирования иммуноглобулинов и гликопротеинов [42].

Для оценки конъюгата использовали коэффициент позитивности (КП) - отношение средней оптической плотности (ОП) лунок с исследуемым образцом к средней оптической плотности отрицательного контрольного образца (ОП К+ / ОП К-). При этом определяли специфическую активность КАГ, соответствующую минимально определяемой концентрации, выражаемой в титре - величине, обратной разведению, КП которого ≥ 3 . Оптимальным считали конъюгат, при использовании которого ОП отрицательного контрольного образца составляла $\leq 0,150$; титр КАГ - ≥ 6400 .

На основании ранее проведенных экспериментов в Пермском НПО «Биомед» по определению оптимальной концентрации биотиновой метки, выбору стабилизирующего буфера и консерванта нами была выбрана следующая схема получения биотинилированных антител кролика:

- Готовят раствор биотина в ДМСО из расчета 3 мг/мл.

- Добавляют раствор биотина к аффинноочищенным антителам с содержанием белка 1 - 1,3 мг/мл в молярном соотношении биотин/IgG-антитела=17.
- Биотинилирование ведут в условиях постоянного перемешивания при температуре 4 °С на шуттель-аппарате (130 колебаний/мин) в течение 2-х часов.
- Биотинилированные пробы диализуют при температуре 4 °С против 0,01 М фосфатного солевого буфера в соотношении 2 мг белка на 500 мл буфера при постоянном перемешивании, проводя 3-4 смены буфера через каждые 30 мин.
- В готовый конъюгат добавляют стабилизатор – бычий сывороточный альбумин (содержание БСА в конъюгате – 1 %), и консервант – 5-бром-5-нитро-1,3-диоксан (содержание БНД в конъюгате – 0,05 %).

Всего нами было проведено 28 опытов по приготовлению биотинилированного конъюгата.

При конструировании конъюгатов особое значение имеет выбор антительных препаратов. В связи с этим нами были проанализированы варианты приготовления конъюгатов на основе антител, полученных двумя способами аффинной хроматографии: колоночным и batch-методом. Для приготовления специфических конъюгатов использовали аффинноочищенные антитела концентрацией 1,0-1,5 мг/мл. При этом показано, что применение антител, полученных с помощью колоночного варианта аффинной хроматографии, позволяет максимально снизить уровень фоновых реакций ($K \leq 0,06$) при достаточно высокой чувствительности (определяемый титр контрольного КАГ – 8000-12800) (табл. 28).

Таблица 28

Сравнительная оценка конъюгатов на основе аффинноочищенных антител, полученных с использованием колоночного и batch-метода

Batch-метод аффинной хроматографии		Колоночный метод аффинной хроматографии	
Титр КАГ	ОП К-	Титр КАГ	ОП К-
8500±934	0,078±0,007	10000±1870	0,051±0,009

Кроме того, нами была проведена сравнительная оценка конъюгатов, приготовленных на основе антител, полученных из сывороток кроликов, иммунизированных коклюшной суспензией и бесклеточным коклюшным антигеном (табл. 29).

Таблица 29

Сравнительная оценка конъюгатов на основе антител, полученных из сывороток кроликов, иммунизированных коклюшными антигенами

Антиген для иммунизации кроликов			
КС		КАГ	
Титр КАГ	ОП К-	Титр КАГ	ОП К-
6800±747	0,055±0,007	10000±1870	0,051±0,009

В связи с тем, что КАГ в своем составе содержит все основные антигены клетки *Bordetella pertussis*, спектр коклюшных антител аналогичен в сыворотках кроликов, иммунизированных КАГ и цельноклеточным препаратом [155]. Однако в проведенных экспериментах удавалось получать конъюгаты с наибольшей чувствительностью при использовании антител, полученных из сывороток животных, иммунизированных КАГ (табл. 29).

Следующим этапом нашей работы была оценка длительности хранения полученных конъюгатов. Было показано, что биотинилированные аффинноочищенные антитела кролика, стабилизированные с помощью БСА и БНД, сохраняют свою специфическую активность в течение 15 мес при температуре от 2 до 8 °С (срок наблюдения).

5.2. Конструирование иммуноферментной тест-системы

для оценки антигенной фракции *Bordetella pertussis*.

Изучение стабильности тест-системы при хранении

Основные физико-химические параметры ИФА, а именно чувствительность, точность и воспроизводимость, могут существенно изменяться при варьировании

условий проведения эксперимента, что обуславливает необходимость оптимизации каждой стадии анализа.

Для определения оптимальных условий проведения ИФА были исследованы варианты возможных реагентов и параметры их применения: сенсibiliзирующей дозы антител, блокирующего агента, системы детекции, субстрата; определены оптимальные концентрации реагентов, состав, рН буферных растворов, а также оптимальная температура и время проведения отдельных этапов реакции.

В системе твердофазного ИФА для определения антигенов антитела применяются непосредственно для сенсibiliзации твердой фазы. Поэтому первоначально была поставлена серия оценочных экспериментов по исследованию условий сорбции коклюшных антител на полистироловую основу. Параллельно нами были проведены исследования по использованию в качестве подложки цельной кроличьей сыворотки к коклюшной суспензии и КАГ. Сравнительная оценка показала, что применение для сорбции планшетов аффинноочищенных антител позволяет значительно повысить чувствительность ИФТС (в 10-15 раз). Кроме того, установлено, что использование антител, полученных колоночным методом аффинной хроматографии, позволяет максимально снизить уровень фоновых реакций ($K \leq 0,06$).

Для определения оптимальной сенсibiliзирующей дозы была проведена серия оценочных экспериментов, в которых на планшеты наслаивались антительные препараты в различных концентрациях: от 1 мкг до 10 мкг. На основании результатов этих опытов в качестве сенсibiliзирующей была выбрана концентрация аффинноочищенных антител 2 мкг/мл (по белку) (табл. 30).

Таблица 30

Выбор оптимальных условий получения иммуносорбентов

Фиксирующий буферный раствор	Концентрация антител	Титр КАГ	КП	ОП К-
КББ	1,0 мкг/мл	6400	4,05	0,031
	2,0 мкг/мл	12800	4,97	0,030
	4,0 мкг/мл	12800	4,46	0,050
	8,0 мкг/мл	6400	4,10	0,089
	10,0 мкг/мл	6400	3,10	1,07

ФСБ	1,0 мкг/мл	6400	3,15	0,030
	2,0 мкг/мл	12800	3,87	0,031
	4,0 мкг/мл	6400	4,02	0,050
	8,0 мкг/мл	6400	3,89	0,085
	10,0 мкг/мл	6400	3,00	1,00

При выборе оптимального значения рН буферного раствора для фиксации антительных препаратов на полистироловых планшетах взяты 0,06 М карбонат-бикарбонатный и 0,01 М фосфатный буферные растворы, рН $9,6 \pm 0,1$ и $7,2 \pm 0,1$ соответственно. Было показано, что интенсивность реакции и КП выше с использованием карбонатно-бикарбонатного буферного раствора, рН $9,6 \pm 0,1$.

Для определения оптимального температурного режима и длительности инкубации антител на полистироловых планшетах были испытаны следующие параметры: 1, 2, 6 и 18 часов при 4 и 37 °С. Результаты изучения влияния температуры и времени сорбции антител на интенсивность реакции показали, что оптимальными условиями являются: температура - 4 °С и время инкубации - 18-20 часов.

Таким образом, на основании проведенных исследований выбраны следующие условия сенсibilизации планшетов: доза аффинноочищенных антител 2 мкг/мл (по белку), карбонат-бикарбонатный буферный раствор рН $9,6 \pm 0,1$, время и температура инкубации 18-20 часов при 4 °С.

Далее нами изучалась стабильность иммобилизованных антител в процессе хранения. В качестве раствора для фиксации антительных препаратов на подложке и их хранения в иммобилизованном виде испытывали как ранее выбранный в качестве оптимального для сенсibilизации карбонат-бикарбонатный, так и альтернативный калийно-фосфатный буферные растворы. Полистироловые планшеты с сорбированными антителами запаивали в пакеты с силикагелем и хранили при температуре от 2 до 8 °С. Было определено, что активность иммобилизованных антител падала в 4 раза уже после 14 сут хранения независимо от выбранного раствора для фиксации.

Для решения данной проблемы нами была введена стадия дополнительной обработки сенсibilизированных планшетов 4 % раствором сахарозы, содержа-

щим БСА в концентрации 1 мг/мл. Как оказалось, применение стабилизирующего раствора способствует сохранению свойств иммобилизованных антител в течение 6 месяцев (срок наблюдения) как при температуре от 2 до 8 °С, так и в условиях ускоренного хранения при 37 °С (табл. 31).

Таблица 31

Результаты изучения стабильности
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КОКЛЮШНЫХ АНТИТЕЛ

Условия хранения	Фиксирующий буферный раствор	Вариант сорбции	Срок наблюдения, мес					
			0	0,5	1	2	4	6
2–8 °С	ФСБ	Обработка стабилизир. р-ром	12800*	12800	12800	12800	12800	6400
		Без доп. обработки	12800	3200	3200	3200	200	-
	КББ	Обработка стабилизир. р-ром	12800	12800	12800	12800	12800	12800
		Без доп. обработки	12800	3200	3200	400	200	-
37 °С	ФСБ	Обработка стабилизир. р-ром	12800	12800	12800	12800	12800	6400
		Без доп. обработки	12800	800	800	800	200	-
	КББ	Обработка стабилизир. р-ром	12800	12800	12800	12800	12800	12800
		Без доп. обработки	12800	200	-	-	-	-

Примечание: * - титр КАГ.

При этом было показано, что для фиксации антител с целью их длительного хранения также более предпочтительным является применение карбонат-бикарбонатного буферного раствора. Так, несмотря на одинаковые значения титра при использовании разных фиксирующих буферных растворов, КББ обеспечивает

более высокий КП и четкую разницу между оптической плотностью лунок с разными разведениями КАГ (табл. 32).

Таблица 32

Интенсивность иммуноферментной реакции при использовании
разных фиксирующих растворов

Фиксирующий буферный раствор		КББ		ФСБ	
		Значение ОП	Значение КП	Значение ОП	Значение КП
Разведения КАГ	1:200	1,212	40,40	0,860	26,88
	1:400	1,111	37,03	0,701	22,61
	1:800	0,860	26,87	0,551	17,77
	1:1600	0,636	21,20	0,384	12,39
	1:3200	0,396	13,20	0,240	7,74
	1:6400	0,242	8,07	0,140	4,52
	1:12800	0,149	4,97	0,120	3,87
	1:25600	0,087	2,90	0,089	2,87
ОП К-		0,030		0,031	
Титр КАГ		12800		12800	

Важной задачей при проведении анализа с применением иммуносорбентов является максимальное снижение связывания меченного ферментом соединения и других компонентов иммуноферментной реакции с поверхностью носителя. Наиболее эффективным путем подавления неспецифического связывания с носителем является проведение анализа в буферном растворе, содержащем блокирующие вещества, которые отличаются антигенной индифферентностью и высокой «липкостью» к твердой фазе. К таким относят неионные детергенты, поверхностно-активные вещества (наиболее часто используется твин-20). Они надежно блокируют не занятые специфическим реагентом участки твердой фазы. В свою очередь, для предупреждения вымывания блокирующего покрытия при последую-

щих промывках используют растворы, содержащие то же самое блокирующее вещество [51].

В серии экспериментов было установлено, что введение в состав 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора с рН 7,2 твина-20 и казеината натрия является оптимальным, обеспечивая значительное уменьшение фоновых реакций.

Одним из параметров, отражающих чувствительность ИФА, является разность между значениями ОП К⁺ и ОП К⁻, выражаемая в титре определяемого антигена. Важным фактором, который может увеличивать эту разность, является концентрация ферментного конъюгата в реакции.

В связи с этим было проведено изучение влияния концентрации конъюгата на интенсивность хромогенной реакции (табл 33).

Таблица 33

Влияние концентрации конъюгата на чувствительность анализа

Разведение конъюгата	ОПК-	Чувствительность анализа, (титр КАГ)
1:1000	0,257	6400
1:2000	0,136	6400
1:4000	0,092	6400
1:8000	0,042	<u>12800</u>
1:16000	0,039	6400
1:32000	0,033	3200

Как видно из таблицы, при высокой концентрации конъюгата происходит его избыточное связывание с носителем, а при низкой концентрации конъюгата заметно снижается чувствительность анализа. Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что оптимальным разведением разработанного нами конъюгата на основе биотинилированных аффинноочищенных антител кролика является 1:8000.

Также нами были испытаны 2 варианта хромогенных субстратов:

1. Субстрат собственного приготовления - цитратно-фосфатный буферный раствор с перекисью водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМБ) в качестве хромогена.

2. Коммерческий субстрат фирмы «Хема» также на основе ТМБ.

Установлено, что использование готового коммерческого субстрата позволяет увеличить чувствительность реакции в 2-4 раза.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана конструкция ИФТС, основанная на взаимодействии аффинноочищенных антител, иммобилизованных на полистироловом планшете, с комплексом коклюшными антигенами. После фиксации на твердой фазе антигенной фракции не прореагировавшие компоненты системы удаляют из сферы реакции путем последовательных промывок белково-солевым раствором с детергентом. Образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляют с помощью амплифицирующей авидин-биотиновой системы, состоящей из аффинноочищенных коклюшных антител кролика, меченных биотином, и авидина, меченного пероксидазой хрена, которая обуславливает гидролиз перекиси водорода, регистрируемой по изменению окраски индикатора.

(рис. 14).

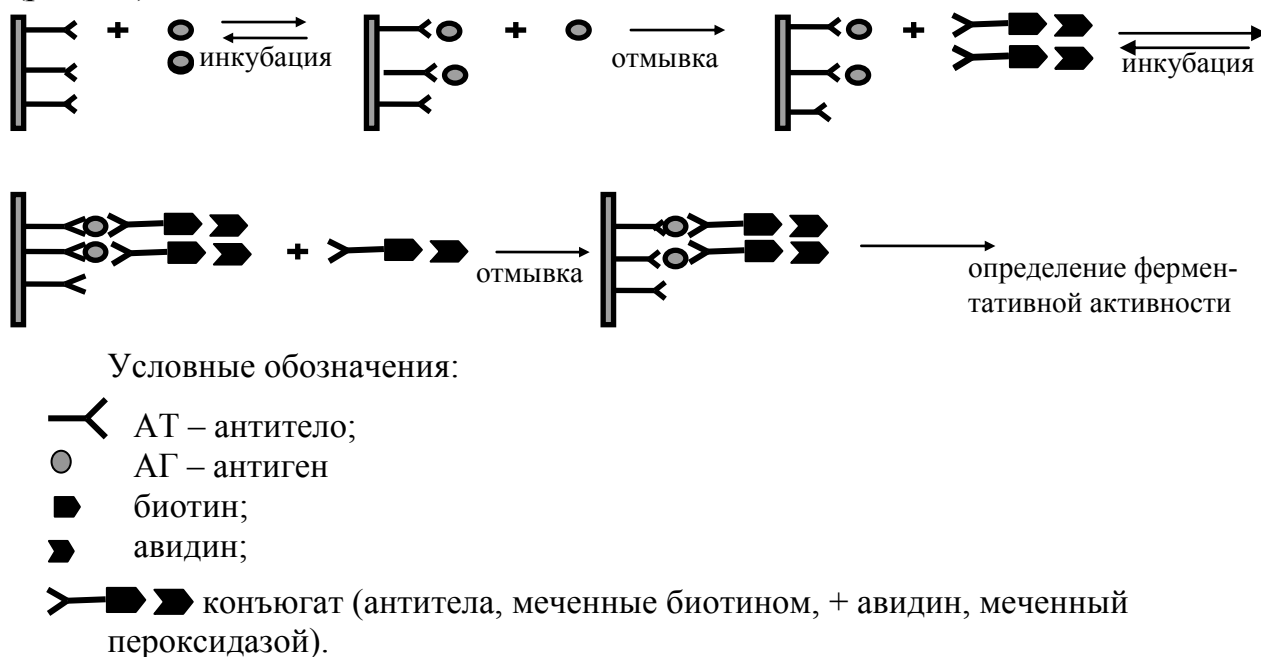


Рис. 14. Схема проведения ИФА

Использование данной тест-системы для определения специфической активности субстанции БКВ требует стандартизации учета результатов по оценке содержания коклюшных антигенов. Это ставит задачу разработки положительно-контрольного образца с заданной специфической активностью, а также эталонного препарата сравнения – стандартного образца.

В настоящее время нет международного стандарта субстанции бесклеточной коклюшной вакцины, одобренного Всемирной Организацией Здравоохранения. В связи с этим нами был разработан «in-house» стандартный образец, представляющий собой экспериментальную серию субстанции коклюшной бесклеточной вакцины.

В данном стандартном образце нами была определена специфическая активность, соответствующая минимально определяемой концентрации, выражаемой в титре - величине, обратной разведению, КП которого ≥ 3 . Для определения точности результатов измерения титра была проведена валидация метода оценки специфической активности стандартного образца.

Как видно из представленной таблицы 34, при определении прецизионности (сходимости и воспроизводимости) относительное стандартное отклонение – RSD (или коэффициент вариации) находится в пределах нормы (менее 5 % и 10 % соответственно), что свидетельствует о точности результатов измерений специфической активности стандартного образца.

Таблица 34

Определение валидационных характеристик
при оценке специфической активности стандартного образца
субстанции бесклеточной коклюшной вакцины

Разведение	Исполнитель	Среднее значение КП	Критерий приемлемости для КП	RSD (ВКВ), %	Норма%	RSD (МКВ), %	Норма%
1:1250	1	23,85	> 3	3,78	< 5	8,28	< 10
	2	20,48		0,17			
	3	23,91		0,74			
1:2500	1	13,64		4,32		2,90	
	2	13,25		1,40			
	3	13,24		1,90			
1:5000	1	7,88		2,58		4,13	
	2	7,97		2,61			
	3	7,38		1,72			
1:10000	1	4,59		3,33		5,30	
	2	4,61		3,48			
	3	4,19		2,45			
1:20000	1	2,83	4,82	5,63			
	2	2,68	1,97				
	3	2,53	3,11				

На основании полученных результатов и их сравнения с критериями приемлемости установлено, что определяемый титр стандартного образца, соответствующий специфической активности в ИФА, составляет 10000 условных иммуноферментных единиц. Таким образом, определенная нами специфическая активность стандартного образца субстанции БКВ составляет 10000 иммуноферментных единиц в 1 мл (ИЕ/мл).

Разработанный стандартный образец был лиофильно высушен в присутствии 8 % сахарозы в качестве протектора и 0,01 % мертиолята в качестве консерванта, заложен на хранение.

На следующем этапе по данному стандарту нами был откалиброван положительный контрольный образец, представляющий собой одну из экспериментальных серий субстанции бесклеточной коклюшной вакцины, с целью применения его в качестве калибратора с известным титром. Было определено, что специфическая активность калибратора составляет 10800 ИЕ/мл.

Таким образом, набор для определения специфической активности субстанции бесклеточной коклюшной вакцины с использованием биотинилированного конъюгата включает следующие ингредиенты:

1. Иммуносорбент – полистироловый планшет с иммобилизованными аффинноочищенными коклюшными антителами кролика.
2. Конъюгат – аффинноочищенные коклюшные антитела кролика, меченные биотином, в комплекте с авидином, меченным пероксидазой хрена (фирмы «Sigma» или аналогичной).
3. Контрольный положительный образец – субстанция бесклеточной коклюшной вакцины с известным титром специфической активности.
4. Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т) для приготовления раствора для промывания планшетов, приготовления растворов образцов и конъюгата.
5. Блокатор (Б) – белково-солевой раствор.
6. Хромогенный субстрат фирмы «Хема».
7. Стоп-реагент – 5 %-ный раствор серной кислоты.

На основании полученных данных оптимизирована схема проведения ИФА.

Порядок проведения испытаний

1. Внесение контрольного и исследуемых образцов.

В лунки А12-Н12 вносят по 100 мкл фосфатно-солевого буферного раствора с твином и блокатором (ФСБ-Т-Б) (отрицательный контроль). В лунки А1 и А2 вносят по 0,2 мл рабочего разведения контрольного положительного образца. Проводят титрование 2-кратным шагом по 0,1 мл с А1-А2 по Е1-Е2. Исследуемые образцы вносят по 0,2 мл в лунки А3 – А11, после чего также проводят титрование 2-кратным шагом по 0,1 мл с А3-А11 по Н3 - Н11. Инкубируют планшет в течение (60 ± 5) минут при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ Удаляют несвязавшиеся компоненты и промывают раствором ФСБ-Т-Б.

2. Внесение конъюгата. В каждую лунку планшета вносят по 0,1 мл рабочего разведения конъюгата и инкубируют в течение (60 ± 5) минут при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Удаляют несвязавшийся конъюгат и промывают ФСБ-Т-Б.

3. Внесение хромогенного субстрата. Вносят в каждую лунку планшета по 0,1 мл хромогенного субстрата «Хема». Планшет выдерживают при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 20 мин в защищенном от света месте.

4. Внесение стоп-реагента. Реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 0,1 мл стоп-реагента и немедленно измеряют ОП спектрофотометрически при двух длинах волн 450/620 нм.

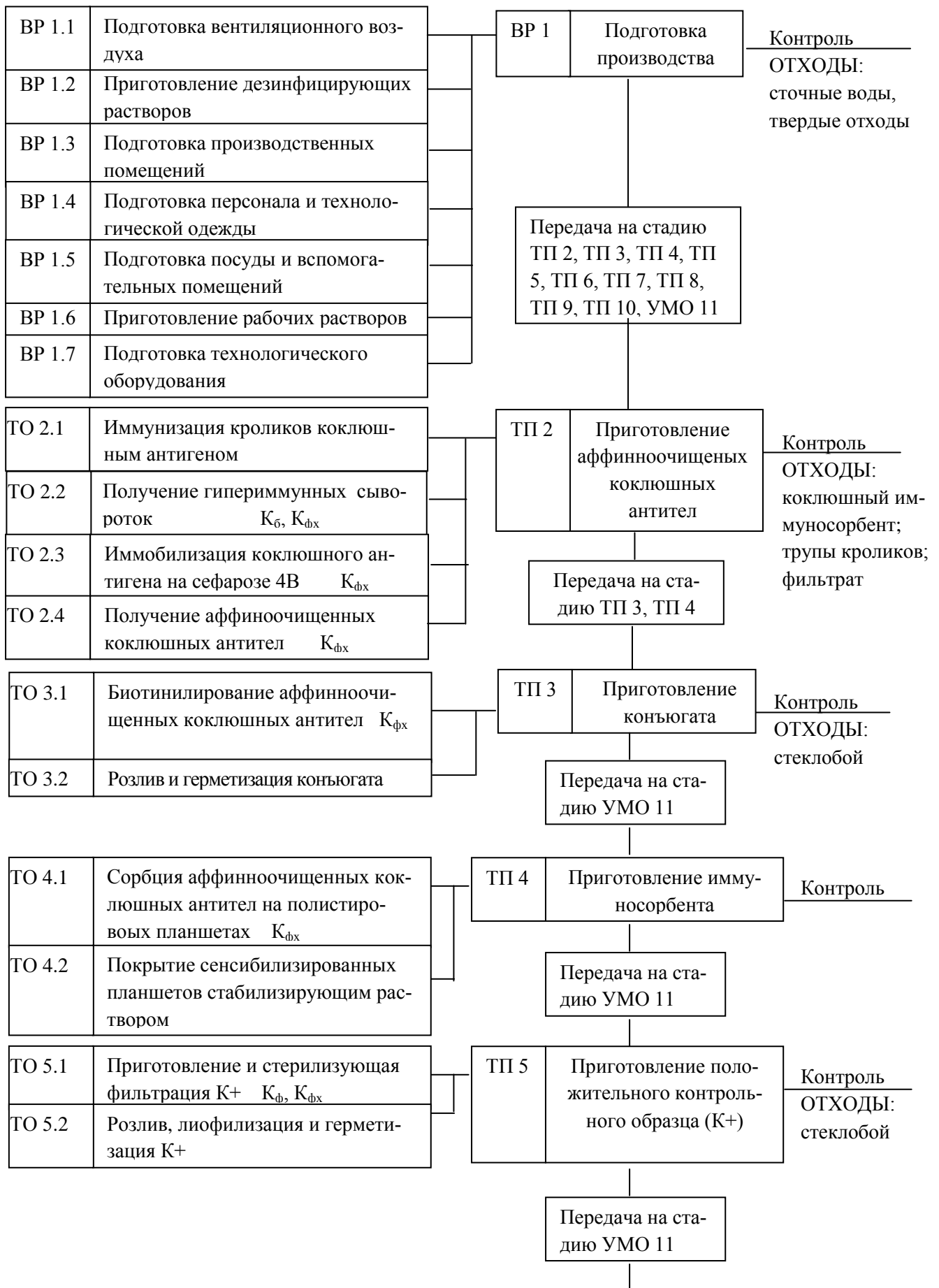
5. Оценка результатов. Оценку результатов иммуноферментной реакции проводят по калибровочному графику либо с использованием компьютерной программы количественного определения антигенов и специфических антител, разработанной ранее в НПО «Биомед» [32, 57]. Для этого в шаблон вносятся значения ОП контрольного положительного образца, а также содержание ИЕ/мл с учетом разведения. Далее по калибровочному графику определяют диапазон, где Y (\lg ОП положительного контрольного образца) линейно зависит от X (\log_2 кратности его разведения). Затем в программу вносят те значения ОП и разведения исследуемых образцов, которые находятся в пределах выбранного линейного участка, и запускают программу (табл. 35). Результаты реакции выражаются в ИЕ/мл.

Результаты расчета специфической активности субстанции БКВ с помощью компьютерной программы

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Развед.	S ₁	S ₁	500	500	500	500	500	500	500	500	S ₍₋₎
	ОП	0,974	0,975	1,538	1,538	1,538	1,538	0,869	0,869	0,869	0,869	0,025
	Конц.*	10,8	10,8	(+)10251,9	(+)10251,9	(+)10251,9	(+)10251,9	4660,5	4660,5	4660,5	4660,5	4660,5
B	Развед.	S ₂	S ₂	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	S ₍₋₎
	ОП	0,573	0,577	0,95	0,95	0,95	0,95	0,521	0,521	0,521	0,521	0,025
	Конц.*	5,4	5,4	10527,8	10527,8	10527,8	10527,8	4694,2	4694,2	4694,2	4694,2	4694,2
C	Развед.	S ₃	S ₃	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	S ₍₋₎
	ОП	0,33	0,332	0,568	0,568	0,568	0,568	0,302	0,302	0,302	0,302	0,025
	Конц.*	2,7	2,7	10522,2	10522,2	10522,2	10522,2	4674,9	4674,9	4674,9	4674,9	4674,9
D	Развед.	S ₄	S ₄	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	S ₍₋₎
	ОП	0,198	0,199	0,333	0,333	0,333	0,333	0,156	0,156	0,156	0,156	0,025
	Конц.*	1,35	1,35	10559,3	10559,3	10559,3	10559,3	4319,5	4319,5	4319,5	4319,5	4319,5
E	Развед.	S ₅	S ₅	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	S ₍₋₎
	ОП	0,096	0,098	0,209	0,209	0,209	0,209	0,078	0,078	0,078	0,078	0,025
	Конц.*	0,675	0,675	12016,6	12016,6	12016,6	12016,6	(-)4351,1	(-)4351,1	(-)4351,1	(-)4351,1	(-)4351,1
F	Развед.	S (-)	S (-)	16000	16000	16000	16000	16000	16000	16000	16000	S ₍₋₎
	ОП	0,025	0,025	0,098	0,098	0,098	0,098	0,047	0,047	0,047	0,047	0,025
	Конц.*			10727,7	10727,7	10727,7	10727,7	(-)5834,9	(-)5834,9	(-)5834,9	(-)5834,9	(-)5834,9
G	Развед.			32000	32000	32000	32000	32000	32000	32000	32000	S ₍₋₎
	ОП			0,063	0,063	0,063	0,063	0,042	0,042	0,042	0,042	0,025
	Конц.*			(-)14542,3	(-)14542,3	(-)14542,3	(-)14542,3	(-)10812,7	(-)10812,7	(-)10812,7	(-)10812,7	(-)10812,7
H	Развед.			64000	64000	64000	64000	64000	64000	64000	64000	S ₍₋₎
	ОП			0,048	0,048	0,048	0,048	0,042	0,042	0,042	0,042	0,025
	Конц.*			(-)23687,1	(-)23687,1	(-)23687,1	(-)23687,1	(-)21625,4	(-)21625,4	(-)21625,4	(-)21625,4	(-)21625,4

Таким образом, итогом проведенных исследований явилась разработка набора реагентов «ИФА КАГ» для определения специфической активности вакцины коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции. На разработанную ИФТС был составлен пакет документов, включающий инструкцию по применению, технические условия и промышленный регламент.

Полная технологическая схема производства набора реагентов «ИФА КАГ» представлена на рисунке 15.



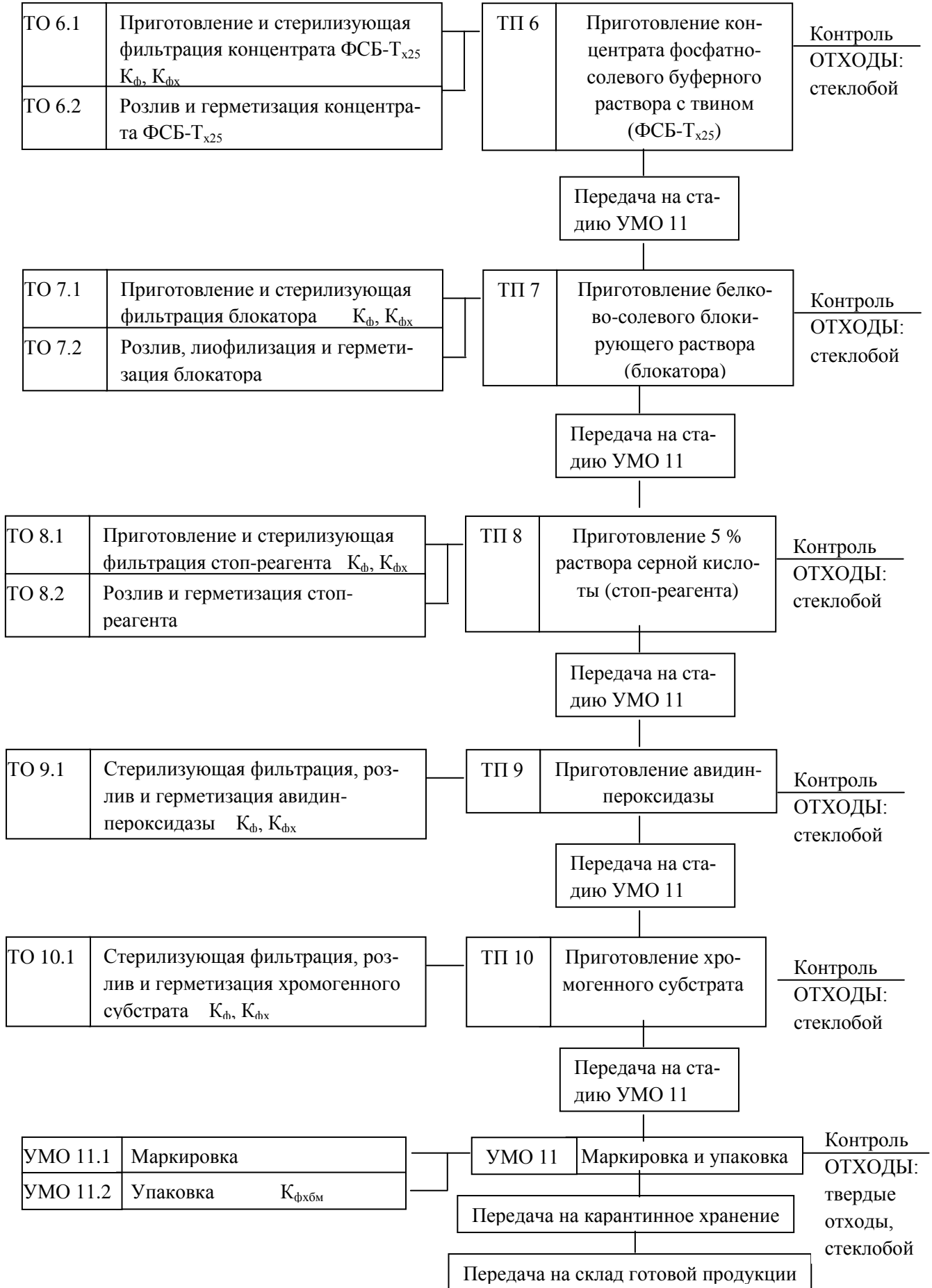


Рис. 15. Технологическая схема производства "ИФА КАГ"

Следующим этапом нашей работы являлась оценка соответствия разработанной иммуноферментной тест-системы утвержденным стандартам качества.

5.3. Валидация иммуноферментной тест-системы для оценки специфической активности субстанции бесклеточной коклюшной вакцины

С целью экспериментального доказательства пригодности разработанной иммуноферментной тест-системы для определения специфической активности субстанции бесклеточной коклюшной вакцины, нами были определены следующие валидационные характеристики: правильность, прецизионность (сходимость и воспроизводимость), линейность и параллелизм, специфичность, робастность, диапазон применения и предел количественного определения.

В качестве стандарта использовали разработанный нами стандартный образец субстанции бесклеточной коклюшной вакцины. В качестве калибратора – положительный контрольный образец с титром 10800 ИЕ/мл. Испытуемый образец представлял собой одну из экспериментальных серий субстанции бесклеточной коклюшной вакцины.

Учитывая рекомендации Европейской Фармакопеи для проведения валидации иммуноферментного анализа [134], рассчитывали среднее значение специфической активности для трех разведений каждого из испытуемых образцов.

Правильность методики

Правильность метода оценивали посредством анализа корреляции между значением специфической активности стандартного образца, которое было принято как условно истинное, и полученным в нескольких постановках значением, которое, согласно критерию приемлемости, должно было составлять 80-120% от истинного значения.

Результаты определения правильности методики оценки специфической активности субстанции БКВ

№ измерения	1	2	3	4	5	6	7	8
Измеренная специфическая активность, ИЕ/мл	10534,5	9920,3	9565,9	10299,2	10664,5	10444,5	10251,5	10808,8
Истинное значение ИЕ/мл	10000							
%	105,3	99,2	95,7	103,0	106,6	104,4	102,5	108,1
Среднее измеренное значение ИЕ/мл	10311,2							
Средний %	103,1							
Норма	80 – 120 %							
Стандартное отклонение	405,7							
RSD	3,93							
Норма	RSD ≤ 5%.							

Как видно из представленной таблицы 36, измеренная специфическая активность стандартного образца лежит в пределах допустимого диапазона (103,1%), что удовлетворяет критериям приемлемости и свидетельствует о правильности методики.

Прецизионность методики

Прецизионность методики, определяемая двумя параметрами (сходимость и воспроизводимостью), выражается коэффициентом вариации. Чем меньше коэффициент вариации, тем выше точность результатов анализа.

Для оценки прецизионности мы сравнили как внутри- так и межпостановочные корреляции, рассчитанные для 9 определений, выполненных тремя исполнителями в разные дни.

**Результаты определения прецизионности методики оценки
специфической активности субстанции БКВ**

Образец	Исполнитель	Среднее	RSD (БКВ), %	Норма	RSD (МКВ), %	Норма
Стандартный	1	10080,1	4,23	<5	6,04	<10
	2	9244,8	3,74			
	3	10416,9	1,95			
Исследуемый	1	5426,9	3,31		7,82	
	2	4614,0	3,16			
	3	4870,6	4,13			

Как видно из представленной таблицы 37, коэффициент корреляции как в пределах одной серии, так и в разных сериях испытаний находится в пределах нормы, что свидетельствует о достаточно высокой точности результатов измерений.

Линейность и параллелизм

Линейность – способность показать, что результаты теста сразу или после определенной математической обработки пропорциональны концентрации аналита в контрольном образце [26, 27].

Параллелизм - степень идентичности двух кривых доза - ответ, построенных для анализируемого вещества и калибрователя, за исключением смещения вдоль оси дозы одной кривой относительно другой [26, 27].

Дисперсионный анализ, проведенный с помощью компьютерной программы «Паралайн», разработанной в ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России, показал наличие линейности и параллелизма результатов измерения стандартного препарата, калибрователя и экспериментальной серии БКВ (табл. 38, рис. 16), что свидетельствует о правильности выбора контрольного положительного образца, а также схемы и способа приготовления разведений для определения специфической активности с помощью ИФА выпускаемых серий БКВ.

Результаты сравнения специфической активности стандарта,
положительного контрольного образца и
экспериментальной серии БКВ

Источник вариации	Степень свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	F-теор.	F-экспер.	Вывод
Измерения (дозы)	14	6,4197	0,4585	1,92	593,58	Значимо
Препараты	2	0,0154	0,0077	3,20	9,98	Значимо
Линейная регрессия	1	6,4014	6,4014	4,06	8286,49	Значимо
Параллелизм	2	0,0017	0,0008	3,20	1,09	Да
Линейность	9	0,0012	0,0001	2,10	0,17	Да

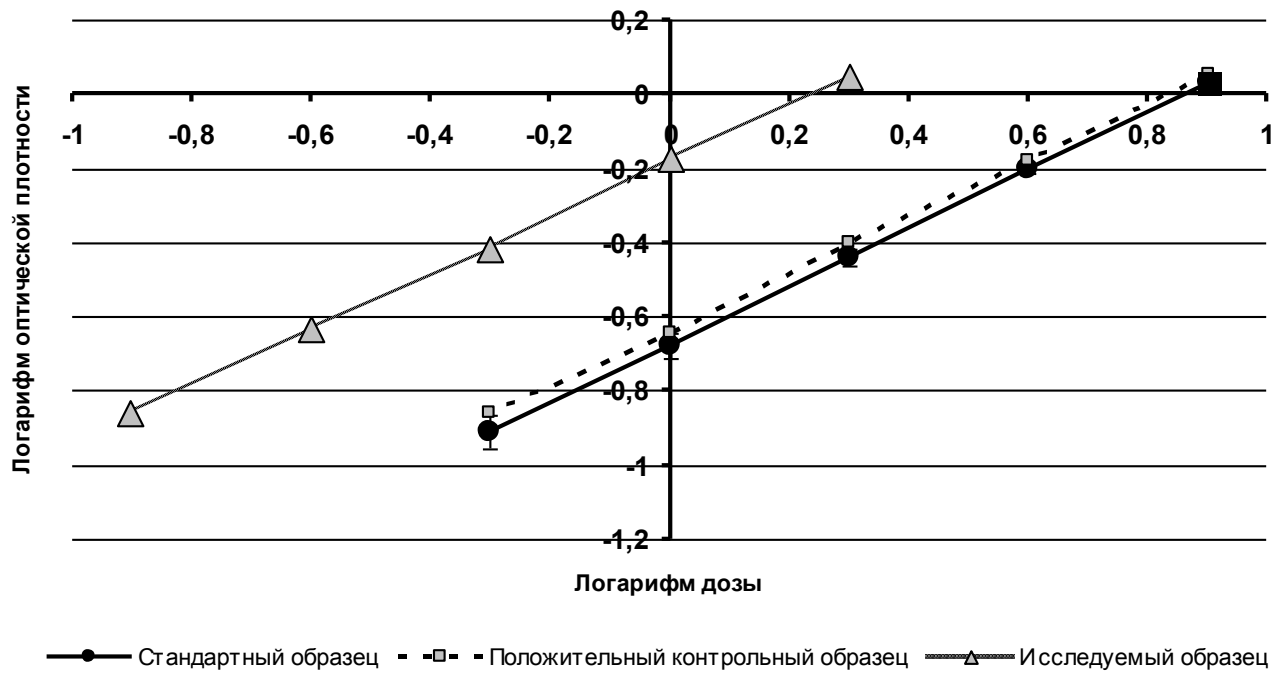


Рис. 16. Сопоставление результатов определения специфической активности стандартного и испытуемого образцов в ИФА

Специфичность

Специфичность разработанной тест-системы была подтверждена с использованием дифтерийного (АД) и столбнячного (АС) анатоксинов – полуфабрикатов комбинированных вакцин. Для этого разные серии гетерологичных антигенов разводили до концентрации 1 Лf/мл, значение ОП лунок с анатоксинами сравнивали со значением ОП лунок с отрицательным контролем. При этом положительным считали образец, КП которого ≥ 3 .

Таблица 39

Результаты определения специфичности методики оценки специфической активности субстанции БКВ

	Среднее ОПк+			Среднее ОПад				Среднее ОПас			
	1:2500	1:5000	1:10000	с. 86	с. 89	с. 113	с. 117	с. 898	с. 933	с. 938	с. 955
ОП	0,694	0,398	0,231	0,046	0,046	0,042	0,050	0,078	0,058	0,056	0,065
ОПк-	0,051			0,046				0,046			
КП	13,61	7,80	4,53	1,00	1,00	0,91	1,09	1,70	1,26	1,22	1,39
Норма	КП ≥ 3			КП < 3				КП < 3			

Из представленных данных (табл. 39) видно, что при постановке реакции с гетерологичными антигенами (дифтерийным и столбнячным анатоксинами) значение КП не превышает 3. При этом величина оптической плотности положительного образца в разведении 1:10000 превышает значение средней арифметической величины оптической плотности лунок с отрицательным контролем в 4,53 раз, что свидетельствует о специфичности тест-системы.

Робастность

Робастность характеризует способность методики не подвергаться влиянию малых, задаваемых (контролируемых) аналитиком изменений в условиях выполнения методики. В качестве таких условий нами были выбраны изменение температурного режима и времени инкубации.

Установлено, что изменение температурного режима на 2 °С и времени инкубации на 10 мин не влияют на результаты определения специфической активности. Как видно из таблицы 40, коэффициент корреляции как в пределах одной постановки, так и при разных условиях проведения испытаний находится в пределах нормы, что подтверждает надежность методики.

Таблица 40

Результаты определения робастности методики оценки специфической активности субстанции БКВ

Образец	Показатель робастности	Условия	Среднее	RSD (ВКВ), %	RSD (МКВ), %	Норма
Стандартный	Температура	35 °С	9959,0	3,38	4,19	<10
		37 °С	10080,1	4,23		
		39 °С	10556,8	3,11		
	Время	50 мин	9702,3	3,04	3,49	
		60 мин	10080,1	4,23		
		70 мин	9704,6	1,97		
Исследуемый	Температура	35 °С	5263,6	2,47	4,18	
		37 °С	5426,9	3,31		
		39 °С	5023,3	2,54		
	Время	50 мин	5519,3	4,86	3,83	
		60 мин	5426,9	3,31		
		70 мин	5580,5	3,72		

Диапазон применения. Предел количественного определения.

При определении диапазона применения придерживались следующего критерия приемлемости: для измеренной специфической активности положительного контрольного образца в каждой из точек калибровочной кривой RSD должно быть менее 10% и критерий Стьюдента должен быть ниже табличного при 11 степенях свободы и уровне значимости 0,05.

Результаты определения диапазона применения методики оценки
специфической активности субстанции БКВ

Истинный титр, ИЕ/мл	Разведение	Спец. акт-ть, соответствующая разведению, ИЕ/мл	Среднее измеренного титра, ИЕ/мл	RSD %	Норма	t критерий Стьюдента	Норма (0,05; 11)
10800	1:1250	8,64	10561,0	2,62	< 10	0,864	< 2,201
	1:2500	4,32	10656,1	3,02		0,447	
	1:5000	2,16	10616,4	2,07		0,834	
	1:10000	1,08	10329,7	3,75		1,214	
	1:20000	0,54	11215,7	4,13		0,897	

При анализе каждой точки калибровочной кривой установлено, что показатели RSD и t критерия Стьюдента для всех точек удовлетворяют критериям приемлемости, что свидетельствует о правильности выбора схемы и способа приготовления разведений контрольного положительного образца для использования его в качестве калибратора в разработанной ИФТС (табл. 41). Кроме того, при определении чувствительности было установлено, что минимальная определяемая концентрация КАГ составляет 0,54 ИЕ/мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что ИФТС для определения специфической активности субстанции бесклеточной коклюшной вакцины по своим качествам в полной мере отвечает требованиям ВОЗ, предъявляемым к наборам для иммунологических испытаний, обеспечивая достаточно высокую степень достоверности результатов анализа.

Следующим этапом нашей работы стало определение области применения разработанной ИФТС.

**5.4. Изучение возможности применения
иммуоферментной тест-системы
в производстве бесклеточной коклюшной вакцины**

Следующим этапом нашей работы стало изучение возможности использования разработанной иммуоферментной тест-системы для оценки специфической активности субстанции бесклеточной коклюшной вакцины.

Аналізу подвергались экспериментально-производственные серии субстанции бесклеточной коклюшной вакцины (табл. 42).

Таблица 42

Результаты определения специфической и удельной активности
субстанции БКВ

Серия субстанции БКВ	Белок, мг	Специфическая активность, ИЕ/мл	Удельная активность, ИЕ на 0,1 мг белка
31	0,90	24789,6±1233,9	2754,4
32	1,00	26468,3±2691,6	2646,8
33	1,40	40400,6±895,3	2885,8
34	1,20	35337,3±575,0	2944,8
35	1,30	48534,6±565,2	3733,4
36	1,45	40695,0±2136,4	2806,6
37+38	1,20	48684,7±2528,4	4057,1
39+40+41	1,00	31356,0±3090,1	3135,6
		M±m	3120,6±506,5

Полученные результаты позволили установить нормы показателей для вновь получаемых серий субстанции БКВ: специфическая активность - не менее 10000 ИЕ, удельная активность - не менее 1000 ИЕ на 0,1 мг белка. Значения данных показателей были включены в раздел «Спецификация» проекта ФСП «Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная, субстанция».

Таким образом, в результате проведенных исследований экспериментально обоснованы и разработаны оригинальные конструкции тест-систем для контроля вакцинных препаратов «ТН-ДСК-КОА» и «ИФА КАГ», проведена их валидация и оценка возможности применения в производственном процессе.

В заключение следует отметить, что применение РКОА с использованием разработанной тест-системы «ТН-ДСК-КОА» для определения подлинности и полноты сорбции позволяет гармонизировать методы контроля вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша с требованиями международных нормативных документов. Кроме того, разработанный тест-набор может быть использован для контроля подлинности зарубежных вакцинных препаратов, поступающих на отечественный рынок. Создание ИФТС для количественной оценки специфической активности субстанции БКВ «ИФА КАГ» является важным звеном в разработке системы контроля вакцинных препаратов с бесклеточным коклюшным компонентом.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология получения антительных препаратов с использованием аффинной хроматографии для конструирования тест-систем на основе РКОА и ИФА.

2. Разработан Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в РКОА «ТН-ДСК-КОА», в состав которого входят окрашенные коаггутинационные диагностикумы. Впервые с применением амплифицирующей системы авидин-биотин разработана конструкция иммуноферментной тест-системы для оценки специфической активности субстанции БКВ.

3. Качество разработанных тест-систем соответствует требованиям ВОЗ, предъявляемым к наборам для иммунологических испытаний, по критериям прецизионности (сходимости и воспроизводимости), чувствительности, специфичности. Для количественной тест-системы «ИФА КАГ» дополнительно показано соответствие валидационных параметров линейности, параллелизма, диапазона применения и робастности критериям, регламентированным действующими нормативными документами.

4. Методы контроля качества вакцинных препаратов с использованием разработанных тест-систем «ТН-ДСК-КОА» и «ИФА КАГ» включены в нормативную документацию (регламенты, проекты ФСП "Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина АКДС-Геп В+Нib)", "Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина аАКДС-Геп В+Нib)", "Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная, субстанция").

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю признательность и благодарность за научное руководство, идею настоящей работы, помощь и поддержку при планировании и выполнении исследований доктору биологических наук, профессору Николаевой Алле Максимовне. Благодарю за помощь при выполнении работы кандидата биологических наук Сперанскую Веру Николаевну. Выражаю благодарность сотрудникам научного отдела филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» за помощь в выполнении и анализе исследований.

Выражаю благодарность моей семье за понимание и поддержку. Спасибо всем, кто оказал помощь и содействие при выполнении диссертации!

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1 : Основные положения и определения. – Введ. 2002–11–01. – Москва, 2002. – 23 с.
2. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 2 : Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. – Введ. 2002–11–01. – Москва, 2002. – 42 с.
3. ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002. Точность (правильность и* прецизионность) методов и результатов/измерений. Ч. 3 : Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. – Введ. 2002–11–01. – Москва, 2002. – 35 с.
4. ГОСТ Р ИСО 5725-4-2002. Точность, (правильность, и прецизионность), методов и результатов измерений.. Ч. 4 : Основные⁴ методы определения правильности стандартного метода измерений. – Введ. 2002–11–01. – Москва, 2002. – 23 с.
5. ГОСТ Р ИСО 5725-5-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 5 : Альтернативные методы определения прецизионности. – Введ. 2002–11–01. – Москва, 2002. – 48 с.
6. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002, Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 6 : Использование значений точности на практике. – Введ. 2002–11–01. – Москва, 2002. – 42 с.
7. ГОСТ Р 52249–2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – Введ 2010–01–01 ; взамен ГОСТ Р 52249-2004. – Москва, 2009. – 211 с.
8. Методические указания МУ 3.3.2.1886-04. Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: организация, порядок проведения и представление результатов : (утв. Глав. гос. санитар. врачом Рос. Федерации 04.03.2004). – Москва, 2004. – 31 с.

9. Методические указания МУ 64-04-001-2002. Производство лекарственных средств. Валидация. Основные положения : (утв. распоряжением М-ва пром-сти, науки и технологий Рос. Федерации [б. м., б. г.] – 12 с.
10. ОСТ 42-510-98. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) : (ред. от 25.11.2001). – Введ. 1998–02–25; взамен РД 64-125-91. – Москва, [б. г.].
11. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств : (утв. приказом М-ва пром-сти и торговли Рос. Федерации 14.06.2013 N 916). – Москва, 2013. – 70 с.
12. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1288—03. Находящаяся практика производства медицинских иммунобиологических препаратов. – Москва : Федер. центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 80 с.
13. Адъювантные свойства наночастиц золота / Л. А. Дыкман [и др.] // Рос. нанотехнологии. – 2010. – Т. 5, № 11–12. – С. 58–68.
14. Адъюванты как важный компонент вакцин // Биопрепараты. – 2010. – № 4 (40). – С. 37–39. – Публ. подгот. мед. отд. ГлаксоСмитКляйн Байолоджиалз.
15. Акатов, А. К. Стафилококки / А. К. Акатов, В. С. Зуева. – Москва : Медицина, 1983. – 256 с
16. Аладышева, Ж. И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж. И. Аладышева, В. В. Беляев, В. В. Береговых // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9–14.
17. Алпатова, Н. А. Иммуноадъювантное действие препаратов цитокинового ряда / Н. А. Алпатова, Т. Н. Никитина, Ж. И. Авдеева // Биопрепараты. – 2010. – № 3 (39). – С. 26–27.
18. Антигенный состав и серологические свойства отечественной бесклеточной коклюшной вакцины / Е. М. Зайцев [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – № 6. – С. 76–79.

19. Бектимиров, Т. А. Современные концепции и принципы обеспечения качества при производстве вакцинных препаратов // Вакцинация. – 2000. – № 3 (9). – С. 2–4.
20. Березняк, Е. А. Особенности штаммов *Helicobacter pylori*, циркулирующих в Ростовской области, и конструирование антигенного полимерного хеликобактерного диагностикума : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. А. Березняк. – Ставрополь, 2010. – 18 с.
21. Берлина, А. Н. Применение пероксидазы сои в иммуноферментном анализе : автореф. дис. ... канд. хим. наук / А. Н. Берлина. – Москва, 2010. – 20 с.
22. Бровкина, А. Н. Разработка метода и тест-системы выявления бактерий рода *Salmonella* на основе латекс-агглютинации // Науч. журн. КубГАУ. – 2011. – № 72 (08). – С. 1–9.
23. Бурков, А. Н. Методология конструирования коммерческих тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / А. Н. Бурков. – Москва, 2004. – 37 с.
24. Вакцины и вакцинация : нац. руководство / под ред. В. В.Зверева, Р. М. Хаитова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 640 с
25. Вакцины. Проблемы и перспективы // И. В. Борисевич [и др.] // Биопрепараты. – 2010. – № 3 (39). – С. 8–9.
26. Валидация аналитических методов исследования / Л. Р. Давлетбаева [и др] // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение : материалы конф. с междунар. участием. – Уфа, 2005. – Ч. 1. – С. 34–48.
27. Валидация аналитических методов исследования. Валидация количественного иммуноферментного анализа / Л. Р. Давлетбаева [и др] // Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий : материалы IV Междунар. науч. конф. – Томск, 2006. – Т. 2. – С. 362–365.
28. Вахрамеева, М. С. Анализ антигенной структуры *Helicobacter pylori* и разработка тест-системы для неинвазивной диагностики хеликобак-

териоза : автореф. дис. ... канд. мед. наук / М. С. Вахрамеева. – Москва, 2004. – 27 с.

29. Ведерникова, Н. В. Антитоксический противодифтерийный препарат «Антидифф»: технология получения, иммунобиологическая характеристика : дис. ... канд. мед. наук / Н. В. Ведерникова. – Пермь, 2000. – 152 с.

30. Волкова, Р. А. Система контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов химическими и иммунохимическими методами : дис. ... д-ра биол. наук / Р. А. Волкова. – Москва, 2009. – 276 с.

31. Воробьева, М. С. Сравнительное изучение качества отечественных и зарубежных иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВИЧ типов 1 и 2 и антигена р24 ВИЧ-1 / М. С. Воробьева, К. А. Саркисян // Вакцинология – 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней : материалы Всерос. науч.-практ. конф., Москва, 21–22 нояб. 2006. – Москва, 2006. – С. 31.

32. Вязникова, Т. В. Конструирование иммуноферментных тест-систем на основе авидин-биотинового взаимодействия для определения антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-НВs) : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т. В. Вязникова. – Екатеринбург, 2007. – 26 с.

33. Гореликова, Е. В. Оптимизация клинико-лабораторной диагностики и эпидемиологического надзора за коклюшем : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е. В. Гореликова. – Пермь, 2006. – 25 с.

34. Горина, Л. Г. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антигенов *Mycoplasma pneumoniae* / Л. Г. Горина, Н. Н. Шершнева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 4. – С. 83–86.

35. Гуморальный противокклюшный иммунитет и распространенность коклюша в популяции / Е. М. Зайцев [и др.] // Журн. микробиологии. – 2009. – № 1. – С. 56–58.

36. Давлетбаева, Л. Р. Валидация количественных иммуноферментных тест-систем для контроля качества медицинских иммунобиологических

препаратов : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л. Р. Давлетбаева. – Уфа, 2007. – 24 с.

37. Далматов, В. В. Серологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, управляемыми средствами иммунопрофилактики / В. В. Далматов, М. А. Вайтович, И. П. Бурашникова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2004. – № 5(18). – С. 16–18.

38. Диагностическое значение IgG, IgA и IgM к антигенам *Bordetella pertussis* у больных коклюшем / Е. М. Зайцев [и др.] // Журн. микробиологии. – 2008. – № 6. – С. 23–26.

39. Значение серологического мониторинга за инфекциями, управляемыми средствами специфической профилактики / Е. В. Русакова [и др.] // Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней : сб. науч. трудов. – Москва, 2006. – Вып. 8. – С. 109–113

40. Изучение диагностической эффективности тест-системы «Рота-антиген» для выявления ротавирусной инфекции / И. Н. Индигова [и др.] // Вакцинология – 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней : материалы Всерос. науч.-практ. конф., Москва, 21–22 нояб. 2006. – Москва, 2006. – С. 44–45.

41. Иммунопрофилактика – 2005 / В. К. Таточенко [и др.]. – Москва, 2005. – 190 с.

42. Иммуноферментный анализ : пер. с англ. / под ред. Т. Нго, Г. Ленхоффа. – Москва : Мир, 1988. – 446 с.

43. Карбышев, Г. Л. Совершенствование серологической диагностики легионеллеза : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Г. Л. Карбышев. – Ростов-на-Дону, 2007. – 38 с.

44. Катлинский, А. В. Медицинские иммунобиологические препараты как национальный стратегический резерв // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов : материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию филиала ФГУП «НПО «Микро-

ген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед», 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 11-13.

45. К вопросу о серологической диагностике коклюша / Н. Н. Курова [и др.] // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов : материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию филиала ФГУП «НПО «Микроген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед», 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 55–56.

46. Коровкин, А. С. Методика определения специфической активности вакцин против гепатита В методом ИФА // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов : материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию филиала ФГУП «НПО «Микроген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед», 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 56–58.

47. Краснопольский, Ю. М. Биотехнология иммунобиологических препаратов / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : Фармитек, 2008. – 312 с.

48. Курова, Н. Н. Вакцинопрофилактика коклюша и поствакцинальный иммунитет / Н. Н. Курова, Г. Я. Ценева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2006. – № 3 (28). – С. 12–18.

49. Мац, А. Н. Концепция низкомолекулярных антигенспецифических цитокинов и ее новые практические приложения / А. Н. Мац, М. Н. Бокков, М. Н. Кузьмина // Аллергология и иммунология. – 2008. – № 4. – С. 444–447.

50. Машин, В. В. Новые классы адъювантов // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов : материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию филиала ФГУП «НПО «Микроген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед», 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 48–51.

51. Медицинские лабораторные технологии и диагностика : справочник : в 2 т. Т. 2 / под ред. А.Н. Карпищенко. – Санкт-Петербург : Интрмедика, 1999. – 628 с.
52. Медуницын, Н. В. Вакцинология / Н. В. Медуницын. – Москва, Триада-Х, 2010. – 512 с.
53. Межлабораторная аттестация стандартных образцов при малом количестве лабораторий / В. А. Борисов [и др.] // Стандартные образцы. – 2006. – № 2. – С. 35–41.
54. Морозова, Т. Е. Актуальные вопросы контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств отечественного производства / Т. Е. Морозова, Е. Н. Хосева // Клинич. фармакология и терапия. – 2012. – № 2. – С. 54–58.
55. Морозова, Т. Е. Организация контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств на государственном уровне за рубежом и в России // Качеств. клинич. практика. – 2013. – № 2. – С. 24.
56. Никитина Т. Н. Стимуляция иммунного ответа препаратами цитокинов и их стандартизация : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Т. Н. Николаева. – Москва, 2010. – 28 с.
57. Николаева, А. М. Конструирование комбинированных вакцин и иммуноферментных тест-систем для профилактики и диагностики управляемых инфекций (дифтерия, столбняк, коклюш, гепатит В) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / А. М. Николаева. – Челябинск, 2003. – 44 с.
58. Новаковский, М. Е. Конъюгат биотин-тироксин как бифункциональный лиганд связывающих белков / М. Е. Новаковский, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // Биоорганич. химия. – 2009. – № 35 (2). – С. 178–191.
59. Новая иммуноферментная тест-система для выявления антигена р24 ВИЧ-1 с чувствительностью 0,5 пг/мл / И. Н. Шарипова [и др.] // Клинич. лаборатор. диагностика. – 2008. – № 10. – С. 41–42.

60. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адьювантов при вакцинации / А. С. Сибирцев [и др.] // Биопрепараты. – 2010. – № 3 (39). – С. 22–23.
61. Онищенко, Г. Г. Актуальные проблемы профилактики инфекционных болезней на современном этапе // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 4. – С. 13–22.
62. Оптимизация эпидемиологического надзора и контроля за коклюшной инфекцией / И. В. Фельдблюм [и др.] // Вакцинология. – 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней : тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф., Москва, 21–22 нояб. 2006. – Москва, 2006. – С. 97–98.
63. Орлова, Т. Н. Распространение возбудителя лайм-боррелиоза в Ставропольском крае и совершенствование методов его индикации : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т. Н. Орлова. – Ставрополь, 2009. – 18 с.
64. Отечественная бесклеточная коклюшная вакцина / Н. С. Захарова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2008. - № 1. – С. 35-41.
65. Патент № 2232989 Российская Федерация, МПК: G01N033/531, G01N033/569; регистрационный номер заявки 2002127480/13, Способ получения тест-системы для определения антигенов цитотоксинассоциированных белков *Helicobacter pylori* в биологическом материале инфицированных лиц реакцией коагуляции / Ю. А. Белая [и др.]. – 2002127480/13 ;_опубл. 20.07.2004.
66. Патент № 2247991 Российская Федерация, МПК G01N33/569. Средство, способ его получения и способ для экспресс-диагностики антигена вируса клещевого энцефалита / Л. Е. Подоплекина, В. И. Тарасенко ; патентообладатель Гос. образоват. учреждение высш. проф. образования «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации» (RU). – 2003115135/15. – Оpubл. _10.03.2005, Бюл. №7.

67. Патент № 2282192 Российская Федерация, С 1 G01N, G01N33/543. Способ получения диагностикума для обнаружения дифтерийного токсина / Е. В. Безуглова [и др.] ; ГНИПЧИ. – № 2004137761/15 ; заявл. 23.12.2004, опубл. 20.08.2006.

68. Патент № 2380708 Российская Федерация, С1 G01N 33/531. Способ получения антительной тест-системы для постановки реакции латексной агглютинации / Я. М. Станишевский, И. А. Грицкова, Н. И. Прокопов ; ГОУ ВПО "Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова". – № 2008148003/15 ; заявл. 05.12.2008 ; опубл. 27.01.2010 ; приор. 16.06.99 (Россия). – 5 с.

69. Патент № 2504399 Российская Федерация, МПК А61К39/10, МПК А61Р31/00. Способ получения бесклеточной вакцины для иммунопрофилактики коклюша / А. М. Николаева [и др]. – 2012152561/15 ; заявл 06.12.2012, опубл. 20.01.2014.

70. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 608 с

71. Петровских, В. П. Серологическая индикация и дифференциация ботулинических токсинов-анатоксинов типов А, В и Е : дис. ... канд. биол. наук / В. П. Петровских. – Пермь, 1998. – 144 с.

72. Покровский, В. И. Вакцинопрофилактика. Итоги XX века и перспективы следующего столетия / В. И. Покровский, Б. Ф. Семенов // Журн. микробиологии. – 1999. – № 5. – С. 6–8.

73. Разработка и клинические испытания поливалентных вакцин на основе бесклеточной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины: проблемы и результаты / К. Капио [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2005. – № 2. – С. 31–35.

74. Райхер, Л. И. Экспериментальные материалы к проблеме специфической профилактики и серодиагностики коклюша : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Л. И. Райхер. – Москва, 1971. – 440 с.

75. Реакция коаггутинации и иммуноферментный анализ в комплексной диагностике кампилобактериоза / Л. Ю. Пагнуева [и др.] // // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов : материалы Всерос. науч.-практ.конф., посвящ. 110-летию филиала ФГУП «НПО «Микроген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед», 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 65–66.
76. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Брюсстофф, Д. Мейл. – Москва : Мир, 2000. – 592 с.
77. Руководство по вакцинно-сывороточному делу / под ред. П. Н. Бургасова. – Москва : Медицина, 1978. – 439 с.
78. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н. В. Юргеля [и др.]. – Москва : Спорт и культура – 2000, 2007 – 192 с.
79. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. С. Н. Быковского [и др.]. – Москва : Фармконтракт, 2014. – 656 с.
80. Руководство по надлежащей производственной практике лекарственных средств для человека. – Москва, 2008. – 283 с.
81. Смурова Л. Ю. Конструирование иммуноферментных тест-систем на основе F(ав)₂-фрагментов «чистых» антител для определения бактериальных токсинов (на модели дифтерийного токсина) : дис....канд. биол. наук / Л. Ю. Смурова. – Москва, 1988. – 147 с.
82. Совершенствование лабораторной диагностики коклюшной инфекции / И. В. Фельдблум [и др.] // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2011. – № 3. – С. 46–50.
83. Сперанская, В. Н. К вопросу об экспрессной диагностике гонококковой инфекции / В. Н. Сперанская, Л. Ю. Пагнуева, А. П. Годовалов // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов : материалы Всерос. науч.-практ.конф., посвящ. 110-летию фи-

лиала ФГУП «НПО «Микроген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед», 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 61–63.

84. Сперанская, В. Н. Обоснование и разработка серологических микротестов для определения бактериальных растворимых антигенов на основе реакции коаггутинации : дис . канд. ... биол. наук / В. Н. Сперанская. – Пермь, 1987. – 168 с.

85. Сравнительная характеристика отечественных и зарубежных вакцин для профилактики коклюша, дифтерии и столбняка / Р. П. Чуприна // Биопрепараты. – 2006. – № 4 (24). – С. 27–30.

86. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) / И. В. Борисевич // Биопрепараты. – 2010. – № 4 (40). – С. 8–10.

87. Сухинин, М. В. Коклюш. Требуется новая стратегия диагностики и вакцинопрофилактики // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2005. – 6 (25). – С. 17–21.

88. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров [и др.]. – Москва : Высш. шк., 1991. – 291 с.

89. Термолабильный энтеротоксин *Escherichia coli* в биосубстратах больных кишечными инфекциями / Ю. А. Белая [и др.] // Современ. наукоемкие технологии. – 2005. – № 10. – С. 35.

90. Тимофеева, М. А. Обнаружение стафилококкового токсина в сыворотках крови больных с помощью оригинальной иммуноферментной тест-системы / М. А. Тимофеева, Л. С. Полякова, Л. Ю. Смурова // Теоретические и прикладные исследования в иммунологии. – Пермь, 1990. – С. 17–18.

91. Устинникова, О. Б. Аттестация отраслевого стандартного образца содержания Ви-антигена в брюшнотифозной вакцине / О. Б. Устинникова, Р. А. Волкова, Н. П. Ванеева // Первая Всероссийская конференция по вакцинологии «Медицинские иммунобиологические препараты для профилактики,

диагностики и лечения актуальных инфекций», Москва, 10–11 нояб. 2004 : сб. тез. – Москва, 2004. –С. 72–73.

92. Устинникова, О. Б. К вопросу об аттестации отраслевого стандартного образца содержания Ви-антигена в брюшнотифозной вакцине / О. Б. Устинникова, Р. А. Волкова, Н. П. Ванеева / Биопрепараты. – 2005. – №1 (17). –С. 24–26.

93. Устинникова, О. Б. Стандартизация и валидация методов ракетного иммуноэлектрофореза и иммуноферментного анализа при контроле качества медицинских биологических препаратов : автореф. дис. ... канд. биол. наук / О. Б. Устинникова. – Москва, 2007. – 30 с.

94. Устюгов, Я. Ю. Иммунобиологическая характеристика бесклеточной коклюшной вакцины : автореф. дис. ... канд. биол. наук./ Я. Ю. Устюгов. – Пермь, 2008. – 21 с.

95. Фельдблюм, И. В. Национальный календарь профилактических прививок: проблемы и пути совершенствования Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов : материалы Всерос. науч.-практ.конф., посвящ. 110-летию филиала ФГУП «НПО «Микроген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед», 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 13–15.

96. Хлынцева, А. Е. Разработка комплекса иммунодиагностических тест-систем для обнаружения возбудителя сибирской язвы : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. Е. Хлынцева. – Оболенск, 2012. – 22 с.

97. Чуприна, Р. П. К вопросу о преимуществах и недостатках цельноклеточных и бесклеточных коклюшных вакцин / Р. П. Чуприна, И. А. Алексеева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. – № 2. – С. 62–69.

98. Чуприна, Р. П. Профилактика коклюша: разработка и применение бесклеточной коклюшной вакцины / Р. П. Чуприна, И. А. Алексеева, Н. А. Озерцовский // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – № 1. – С. 99–105.

99. Экспресс-метод определения скрытой крови / Л. Ю. Пагнуева [и др.] // Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в XXI веке : материалы Всерос. науч. конф., посвящ. 105-летию Перм. науч.-производств. об-ния «Биомед», 17–18 июня 2003 г. – Пермь, 2003. – С. 176–179.
100. ISO 5725 (parts 1-6). 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.– Введ. 1994. – [б. м., б. г.].
101. Abhijit, A. The Study of Salmonellosis with reference to *Salmonella typhi* in enteric fever patients / A. Abhijit, N. Sunita // Journal of Clinical and Diagnostic Research. – 2011. –Vol. 5 (3). –P. 467–469.
102. Abuelzein, E. Utilization of the *Staphylococcus aureus* protein A and the *Streptococcus* spp. protein G in immunolabelled techniques [Electronic resource]// Trends in immunolabelled and related techniques. / Book edited by Eltayb Abuelzein Book . – 2012. – P. 333–338. – Режим доступа : <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/36217.pdf>.
103. Acellular and "low" pertussis vaccines: adverse events and the role of mutations / H.G. Higashi [et. al] // Rev. Inst. Med. Trop. – 2009. – № 51(3). – P. 131–134.
104. Adenilate cyclase toxin (ACT) from *Bordetella hinzii*: characterization and differences from ACT of *Bordetella pertussis* / G. M. Donato [et. al] // Journal of Bacteriology. – 2005. – Vol. 187, №. 22. – P. 7579-7588.
105. Advances in immunology and vaccine discovery report of the United States-European Commission workshop / C. G. Gay [et. al] // Vaccine. – 2007. – № 25(41). – P. 7007–7011.
106. Adverse events following immunization with vaccines containing adjuvants / S. Cerpa-Cruz [et. al] // Immunol Res. – 2013. – № 56(2–3). – P. 299–303.
107. Aguilar, J. C. Vaccine adjuvants revisited / J. C. Aguilar, E. G. Rodriguez // Vaccine. 2007. – Vol. 25. – P.3752–3762.
108. Al-Farwachi, M. I. Detection of Brucella antigen in the aborted ovine fetal stomach contents using a modified ELISA test / M. I. Al-Farwachi, B. A. Al-

Badrani, Th. M. Al-Nima // Iraqi. Journal of Veterinary Sciences. – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 1–4.

109. Assessment of IgG avidity against pertussis toxin and filamentous hemagglutinin via an adapted enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using ammonium thiocyanate / G. Almanzar [et al.] // Journal of Immunological Methods. – 2013. – Vol. 387, Issue 1–2. – P. 36–42.

110. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. – Geneva, 1997. – 211 p.

111. Aybay, C. Development of a diagnostic and screening ELISA system for measuring tetanus antitoxoid levels / C. Aybay, R. Karakus, A. G. Gundogdu // Turk. J. Med. Sci. – 2003. – Vol. 33. – P. 289–294.

112. Bansal, A. K. Bioinformatics in microbial biotechnology – a mini review / A. K. Bansal // Microbial Cell Factories. – 2005. – № 4. – P. 1–11.

113. Betsou, F. The C-terminal domain is essential for protective activity of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin / F. Betsou, P. Sebo, N. Guiso. – Infection and Immunity. – 1995, Vol. 63, №. 9. – P. 3309–3315.

114. Bhatt, K. Comparison of blood culture supernatant, serum and urine coagglutination test for diagnosis of typhoid fever / K. Bhatt, C. S. Patil // Ind. J. Med Micro. – 1995. – № 12 (1). – P. 19–23.

115. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis* / B. T Cookson [et. al] // Infection and Immunity/ – 1989. – Vol. 57, № 7. –P. 2223–2229.

116. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology / K. E. Luker [et. al] // Natl. Academy of Science USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 2365–2369.

117. Brewer, J. M. (How) do aluminum adjuvants work? // Immunol. Lett. 2006. – V. 102. – P.10–15.

118. Characterization of the carbohydrate binding and ADP-ribosyltransferase activities of chemically detoxified pertussis toxins / H. Oh [et al.] // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31, Issue 29. – P. 2988–2993.
119. Chattopadhyay, U. K. Coagglutination test for rapid noncultural diagnosis of human *Campylobacteriosis* // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2002. – № 6. – P. 9–11.
120. Compatible diagnostic systems for monitoring of diphtheria infection. / L. I. Reikher [et. al.] // 8th international congress of bacteriology and applied. microbiology division. – Jerusalem, 1996. – P. 8–9.
121. Cunha, M. de L. R. S. *Epidemiology insights*. – Rijeka : Published by InTech, – 2012. – 396 p.
122. Datta, S. M. Immunomagnetic separation and coagglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with anti-flagellar protein monoclonal antibody / S. M. Datta, E. Janes, J. G. Simonson // *Clin. Vacc. Immunology*. – 2008. – № 15. – P. 1541–1546.
123. Del Rio, M. L. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis* / M. L. Del Rio, C. B. Guitierrez, E. F. Rodriguez Ferri // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41. – № 2. – P. 880–882.
124. Design and synthesis of a photocleavable biotin-linker for the photoisolation of ligand-receptor complexes based on the photolysis of 8-quinolinylnyl sulfonates in aqueous solution. / S. Aoki [et. al] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2009. – №. 17. – P. 3405–3413.
125. Development and use of a novel *in vitro* assay for testing of diphtheria toxoid in combination vaccines / L. Coombes [et al.] // *Journal of Immunological Methods*. – 2009. – Vol. 350, Issue 1–2. – P. 142–149.
126. De Wolf, F. A. Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands / F. A. De Wolf, G. M Brett // *Pharmac. Rev.*, 2000. – Vol. 52. – P. 207–236.

127. Differences in avidity of IgG antibodies to pertussis toxin after acellular pertussis booster vaccination and natural infection / A. M. Barkoff [et al.] // *Vaccine*. –2012. – Vol. 30, Issue 48. – P. 6897–6902.
128. Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? / K. H. Mills [et. al] // *Trends Microbiol.* – 2014. – Vol. 21, №2. – P. 49-52.
129. Drane, D. The ISCOMATRIX™ adjuvant / D. Drane, M. J. Pearse // *Immunopotentiators in Modern Vaccines* / S. O'Hagen, editor. – Burlington, 2006. – P. 191-215.
130. Edwards, K. M. Impact of acellular and whole cell pertussis vaccines on disease burden // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 21, № 1. – P. 61-62.
131. Efficient ELISA for diagnosis of active tuberculosis employing a cocktail of secretory proteins of *Mycobacterium tuberculosis* / D. Tiwari [et al.] // *Folia Biol., Praha*. – 2014. –Vol. 60, № 1. – P. 10–20.
132. Effect of solution environment on the purification of pertussis toxin / T. Wu [et al.] // *Chinese Journal of Biotechnology*. – 2008. – Vol. 24, Issue 7. – P. 1279–1284.
133. EURACHEM Guide. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics [Electronic resource]. 1998. – 61 p. – Режим доступа : <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>.
134. European Pharmacopoeia [Электронный ресурс]. Vol. 1. – 7th edition. – 2011. – (EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare)). – Режим доступа . <http://online.edqm.eu/entry.htm>.
135. European Sero-Epidemiology Network (ESEN-2): evaluation of diphtheria antibody tests / C. von Hunolstein [et. al.] // *Eighth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, ELGWD and Diphtheria Surveillance Network (DIPNET)*, 16–18 June 2004. – Copenhagen, 2004. – P. 47.

136. Evaluation of a fourth-generation latex agglutination test for the identification of *Staphylococcus aureus* / G. I. Andriessse [et. al] // *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis.* – 2011. – № 30. – P. 259–264.

137. Evaluation of a latex agglutination test (PYLOGEN) for the detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens / S. Blanco [et al.] // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* – 2009. – Vol. 63, Issue 4. – P. 349–353.

138. Evaluation of a new slide latex agglutination test for diagnosis of vaginal candidosis / V. Hopwood [et al.] // *European Journal of Clinical Microbiology.* – 1987. – Vol. 6, Issue 4. – P. 392-394.

139. Evaluation of endotoxin content of diphtheria-tetanus-acellular pertussis combined (DTaP) vaccines that interfere with the bacterial endotoxin test / M. Ochiai [et. al] // *Vaccine.* – 2003. – №. 21. – P. 1862–1866.

140. Evaluation of the second generation of a commercial latex agglutination test for the detection of rotavirus antigens in fecal samples / P. Dusetty [et al.] // *Journal of Clinical Virology.* – 2013. – Vol. 57, Issue 1. – P. 88–90.

141. Forsgren, A. Protein A from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human γ -globulin / A. Forsgren, J. Sjoquist // *J. Immunol.* – 1966. – № 97. – P. 822–827.

142. Foxman, B. *Molecular tools and infectious disease epidemiology* / B. Foxman. – Burlington : Academic Press, 2012. – 240 p. – Printed in USA.

143. Global immunization: status, progress, challenges and future [Electronic recourse] / P.Duclos [et. al.] // *BMC International Health and Human Rights.* – 2009. – №. 9. – P. 1–11. – Режим доступа : <http://www.biomedcentral.com/info/about/charter/>.

144. Go big and go fast - vaccine refusal and disease eradication / B. Saad [et. al] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – № 368. – P. 1374–1376.

145. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation [Electronic resource] – 14 p. – Режим доступа : <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM386366.pdf>.

146. Guiso, N. Prepared by PAREXEL Medical Marketing // 4 The Global Pertussis Initiative: meeting report from the fourth regional roundtable meeting, April 14–15, 2010, France / N. Guiso, J. Liese, S. Plotkin // Hum. Vaccin. 2011. – Apr\$ 7 (4). – P. 481–488.
147. Hinman, A. R. Comprehensive integrated strategy for cholera prevention and control / A. R. Hinman, P. E. Farmer // Conference Draft. Coalition for Cholera Prevention and Control 2nd Meeting, June 3–4, 2013 / National Institutes of Health. – Bethesda, 2013. – 104 p.
148. Immunoaffinity chromatography / J. Fitzgerald [et. al] // Methods Mol Biol. – 2011. – № 681. – P. 35–59.
149. Implementation of a rapid procedure for distinguishing enterotoxigenic *Clostridium perfringens* / J. El-Jakee [et. al.] // Journal of American Science. – 2010. – № 6 (11). – P. 499–508.
150. Insight into the mechanism of the acquired antibody auto-reactivity / J. D. Dimitrov [et. al.] // Autoimmun. Rev. – 2008. – № 7. – P. 410–414.
151. Improved detection of nasopharyngeal colonization by multiple pneumococcal serotypes by use of latex agglutination or molecular serotyping by microarray / P. Turner [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49 (5). – P. 1784–1789.
152. Innovative vaccine production technologies: the evolution and value of vaccine production technologies / K. Bae [et al.]. // Archives of Pharmacal Research. – 2009. – Vol. 32, № 4. – P. 465–480.
153. Interfering effect of diphtheria-tetanus-acellular pertussis combined (DTaP) vaccines on the bacterial endotoxin test / M. Ochiai [et. al] // Biologicals. – 2001. – № 29. – P. 55–58.
154. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1) [Electronic resource] / Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996, incorporated in November 2005). – 13 p. – Режим доступа :

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.

155. Isbrucker, R. A. Modified binding assay for improved sensitivity and specificity in the detection of residual pertussis toxin in vaccine preparations / R. A. Isbrucker, A. Bliu, F. Prior // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, Issue 15. – P. 2687–2692.

156. IUPAC 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of analysis methods // *Pure Appl. Chem.* – 2002. – Vol. 74, № 5. – P. 835–855.

157. Jiraviriyakul, A. Detection of Staphylococcal protein A (SpA) in culture medium for developing sortase inhibitor screening method // *IJPBS*. – 2012. – Vol. 2, Issue 1. – P. 218–224.

158. Josefsberg, J. O. Vaccine process technology / J. O. Josefsberg, B. Buckland // *Biotechnol Bioeng.* – 2012. – № 109 (6). – P. 1443–1460.

159. Kalia, J. Advances in bioconjugation / J. Kalia, R. T. Raines // *Curr. Org. Chem.* – 2010. – № 14. – P. 138–147.

160. Kronvall, G. Rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by mean of specific antibody adsorbent to protein A-containing staphylococci // *J. Med. Microbiol.* – 1973. – Vol. 6, № 2. – P. 187–190.

161. Langone, J. Complexes containing *Staphylococcus aureus* protein A: composition and biological activity // *J. Biol. Response Hodif.* – 1984. – Vol. 3, № 3. – P. 241–246.

162. Lindmark, R. Binding of immunoglobulin levels in mammalian sera / R. Lindmark, K. Thoren-Tolling, J. Sjoquist // *J. Immunol. Methods*. – 1983. – Vol. 62. – P. 1–13.

163. Mathai, E. Coagglutination in the diagnosis of typhoid fever / E. Mathai, M. V. Jesudason // *Ind. J. Med. Research*. – 1989. – № 2. – P. 287–289.

164. Mattoo, S. Molecular pathogenesis, epidemiology and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* Subspecies / S. Mattoo, J. D. Cherry // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2005. – № 8 (2) – P. 326–382.

165. McClane, B. A. Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin / B. A. McClane, J. T. Snyder // *Journal of Immunological Methods*. – 1987. – Vol. 100, Issue 1–2. – P. 131–136.
166. Methods of endotoxin removal from biological preparations: review / P. O. Magalhaes [et. al] // *Jr. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 2007. – №. 10 (3). – P. 388-404.
167. Microbial characterisation of *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive and respiratory diseases / T. Kostyanov [et. al] // *Journal of IMAB – Annual Proceeding (Scientific Papers)*. – 2010. – Vol. 16, book 3. – P. 66–69.
168. Multicentre evaluation of a new commercial latex agglutination test using a monoclonal antibody for rotavirus detection / E. Kohli [et al.] // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 1989. – Vol. 8, Issue 3. – P. 251–253.
169. Natural endogenous adjuvants / K. L. Rock [et al] // *Springer Semin. Immunopathol.* – 2005. – Vol. 26. – P. 231–246.
170. Noninfluenza vaccination coverage among adults - United States, 2012 / W. W. Williams [et. al] // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2014. – Vol. 63, № 5. – P. 95-102.
171. Notkins A. L. Polyreactivity of antibody molecules // *Trends in Immunology*. – 2004. – № 25. – P. 174–179.
172. Parija, S. C. *Textbook of microbiology and immunology*. – Kumdli, Haryana : Rajkamal Electric Press, 2009. - 700 p.
173. Pashine, A. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants / A. Pashine, N. M. Valiante, J. B. Ulmer // *Nat. Med.*. – 2005. – № 11 (4 Suppl). – S. 63–68.
174. Pertussis: a reemerging infection / J. M. Kline [et. al] // *Am Fam Physician*. - 2013. – Vol. 88, № 8. – P. 507-514.

175. Pertussis vaccine: WHO position paper // Weekly Epidemiological Record, Geneva. – 2005: – Vol. 80, № 4. – P. 29–40.
176. Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid / B. Metz [et al.] // Biologicals. – 2013. – Vol. 41, Issue 4. – P. 231–237.
177. Plotkin, S. A. Vaccines [Electronic recourse] / S. A. Plotkin, W. Orenstein, P. O. Offit. – 6th Ed. – Elsevier Inc. 2012. – 1570 p. – Режим доступа : <http://www.elsevier.com/books/vaccines/plotkin/978-1-4557-0090-5>.
178. Poland, G. A. Vaccinomics and bioinformatics: Accelerants for the next golden age of vaccinology / G. A. Poland, A. L. Oberg. // Vaccine. – 2010. – № 28. – P. 3509–3510.
179. Rapid detection of the poly- γ -D-glutamic acid capsular antigen of *Bacillus anthracis* by latex agglutination / D. P. AuCoin [et al.] // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2009. – Vol. 64, Issue 2. – P. 229–232.
180. Rapid diagnosis of cholera by coagglutination test using 4-h fecal enrichment cultures / M. J. Rahman [et. al.] // Clin Microbiol. – 1988. – Vol. 25, № 11. – P. 2204–2206.
181. Rapid diagnosis of foot and mouth disease in acute and carrier states / B. M. Iman [et. al.] // Egypt. J. Comp. Path. & Clinic. Path. – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 155–173.
182. Rapid diagnosis of ovine *Brucella*, *Campylobacter* and *Salmonella* infections from fetal stomach contents by coagglutination test / O. Erganis [et. al.] // Small Rum. Res. – 2002. – № 45. – P. 123–127.
183. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture supernatants by coagglutination assay / M. V. Jesudason [et. al] // Clin. Microbiol. Infect. – 2005. – № 11. – P. 930–939.
184. Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis* / D. Hozbor [et. al] // Curr Microbiol. – 1999. – № 38(5). – P. 273–278.

185. Ribeiro, M. C. M. Coagglutination for viral DNA preparation of canine parvovirus for molecular diagnosis / M. C. M. Ribeiro, J. J. Araujo // *J. Virol. Methods.* – 2009. – № 161. – P. 305–307.
186. Roper, W. L. CDC's 60th anniversary: director's perspective - W.L.Roper M.D., M.P.H., 1990-1993 / W. L. Roper // *Morbidity and Mortality Weekly Report.* – 2007. – Vol. 56, № 18. – P. 448–452.
187. Rosenthal, K. S. Vaccines: All things considered / K. S. Rosenthal, D. H. Zimmerman // *Clinical and vaccine immunology.* – 2006. – Vol. 13, №. 8. – P. 821–829.
188. *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation / K. L. Atkins [et al.] // *Molecular Immunology/* – 2008. – Vol. 45, Issue 6. – P. 1600–1611.
189. Safety and immune responses following administration of H1N1 live attenuated influenza vaccine in Thais / B. Phonrat [et al.] // *Vaccine.* – 2013. – Vol. 31, Issue 11. – P. 1503–1509.
190. Sato, Y. Development of acellular pertussis vaccines / Y. Sato, H. Sato // *Biologicals.* – 1999. – Vol. 27. – P. 61–69.
191. Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from porcine pleuropneumonia in the Czech Republic during period 2003–2004 / Z. Kucerova [et. al.] // *Vet. Med., Czech.* – 2005. – № 8. – P. 355–360.
192. Serum antibodies against native and denaturated hemagglutinin glycoproteins detected by ELISA as correlates of protection after influenza vaccination in healthy vaccinees and in kidney transplant recipients / S. Grund [et al.] // *Journal of Virological Methods.* – 2013. – Vol. 193, Issue 2. – P. 558–564.
193. Shah, R. C. Pertussis vaccine controversies and acellular pertussis vaccine. / R. C. Shah, A. R. Shah // *Indian Journal of Pediatrics.* – 2003. – Vol. 70. – P. 485–488.
194. The influence of BCG vaccine strain on mycobacteria-specific and non-specific immune responses in a prospective cohort of infants in Uganda / E.J. Anderson [et al.] // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30, Issue 12. – P. 2083–2089.

195. Ulmer J. B. Vaccine manufacturing: challenges and solutions [Electronic recourse] / J. B. Ulmer, U. Valley, R. Rappuoli // Nature Biotechnology. – Published online: 8 November 2006. – Режим доступа ; [doi:10.1038/nbt1261](https://doi.org/10.1038/nbt1261).
196. Vaccine adjuvants and delivery systems / edited by S.Manmohan. – Hoboken : John Wiley and Sons, 2007. – 457 p.
197. Validation of compendial methods // United States Pharmacopeia. – 31-th Ed. – Rockville, 2002. – P. 2256–2259.
198. WHO. Weekly epidemiological record // WHO. – 2005. - Vol. 80 (4). – P. 29-40.
199. WHO. Weekly epidemiological record // WHO. – 2010. – Vol. 85 (40). – P. 385–400.
200. Whole-cell and acellular pertussis vaccination programs and rates of pertussis among infants and young children / D. Vickers [et al.] // CMAJ. – 2006. Vol. 175, № 10. – P. 1213 – 1217.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОКП 93 8882

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России
д.м.н., профессор

В.В. Долгов
20/12 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. генерального директора
ФГУП ЦПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России



Г.В. Смачков
20/12 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ

ТН-ДСК-КОА

Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных
антигенов в реакции коаггутинации

Технические условия

ТУ 9388-164-14237183-2012

Введены впервые

Срок действия

с «20» июни 2012 г.
до «20» июни 2017 г.

2012 г.

Изн. №	
Подпись и дата	
Изн. № дубл.	
Подпись и дата	

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России
в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор филиала
 Казьянин А.В.
«16» марта 2012 г.



АКТ № 1

квалификационных испытаний изделия медицинского назначения

В соответствии с приказом (от 11.03.2012 г № 03/36) директора филиала Казьянина А.В. о проведении квалификационных испытаний установочной серии медицинского изделия: **Набора реагентов ТН-ДСК-КОА (Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаглютинации)**

Комиссия в составе:

председатель – начальник ОКК Перевозчиков А.Б.,

члены комиссии - микробиологи ЛМТК Лузина Т.А., Пономарева Г.А., Пермякова Е.С.

составила настоящий акт в том, что, в соответствии с установленным порядком постановки медицинских изделий на производство, в период с 12.03.2012 г по 15.03.2012 г вышеуказанным предприятием организованы и проведены квалификационные испытания образцов указанного медицинского изделия, выпускаемого в соответствии с проектом Технических условий.


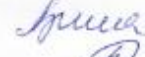


Отбор образцов для испытаний произведен 12.03.2012 г в присутствии представителей комиссии начальником ЛМТК Старцевой Н.В. в количестве 20 наборов реагентов от каждой серии (серия № 4, дата изготовления 0212; серии № 5, дата изготовления 0212).

Квалификационные испытания отобранных образцов медицинского изделия проведены в соответствии с проектом Технических условий (см. таблицу).

Комиссия подтверждает положительные результаты проведенных квалификационных испытаний, соответствие характеристик испытанных образцов требованиям нормативного документа на медицинское изделие, наличие и законность использования предприятием-производителем конструкторской и технологической документации, полноту и стабильность технологического процесса, необходимое качество выполнения всех технологических операций, наличие системы качества производства, готовность производства к серийному выпуску медицинского изделия.

Председатель комиссии:

Члены комиссии:

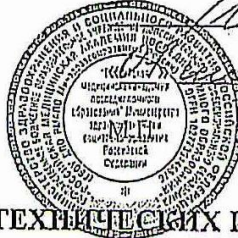
 Перевозчиков А.Б.
 Лузина Т.А.
 Пономарева Г.А.
 Пермякова Е.С.

«УТВЕРЖДАЮ»:

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России,
д.м.н., профессор

Долгов В.В.

2012 г.



ПРОТОКОЛ ТЕХНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ
изделия медицинского назначения - набор реагентов ТН-ДСК-КОА
(тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных
антигенов в реакции коаггутинации).

№ 102/12 от 07.06.12 г.

Испытательная лаборатория (центр): кафедра клинической лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России.

Адрес фактический: 125284, г. Москва, 2-й Боткинский проезд, д. 5, корп. 17.

Тел.: (495) – 945 – 82 – 22; факс: (495) – 945 -84 – 00.

Документы, удостоверяющие полномочия испытательной лаборатории с указанием
области технической компетенции (аккредитации): письмо Федеральной службы по
надзору в сфере здравоохранения и социального развития Министерства здравоохранения
и социального развития Российской Федерации от 09 февраля 2010 года № 04-2436/10.

Наименование изделия: набор реагентов ТН-ДСК-КОА (тест-набор для определения
дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации).

Изготовитель: Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-
производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам
«Микроген» Минздравсоцразвития России (ФГУП НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России), Россия, 115088, г. Москва, ул. 1-я Дубровская, д.15, тел.
(495) 710-37-870); факс 8 (495) 783-88-05.

Цель испытаний: проверка соответствия следующим Национальным законодательным и
нормативным документам в части требований безопасности и эффективности: ГОСТ Р 51352-
99, ГОСТ Р 51088-97, ГОСТ Р 51609-2000, Приказ № 735 от 30.10.2006 Министерства
здравоохранения и социального развития Российской Федерации, а также нормированным
техническим характеристикам (спецификации) изготовителя изделия.

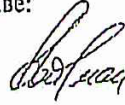
9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

9.1. Образцы изделия №№ серий 4 и 5 технические испытания выдержали и соответствуют требованиям: ТУ 9388-164-14237183-2012, ГОСТ Р 51352-99, ГОСТ Р 51088-97, ГОСТ Р 51609-2000, Приказ № 735 от 30.10.2006 Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Испытания проводили:

Приемочная комиссия в составе:

Председатель комиссии:



Доцент кафедры КЛД РМАПО, к.м.н.,
Ройтман А.П.,

Члены комиссии:



Доцент кафедры КЛД РМАПО, к.м.н.,
Ракова Н.Г.,



Ассистент кафедры КЛД РМАПО, к.м.н.,
Белякова А.А.,

Вывод: при испытании серий 4 и 5 набора реагентов ТН-ДСК-КОА, тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации была показана полная внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов. Аналитические характеристики (специфичность и чувствительность) соответствуют заявленным в ТУ 9388-164-14237183-2012.

Испытания проводили:

Приемочная комиссия в составе:

Председатель комиссии:



Доцент кафедры КЛД РМАПО, к.м.н.,
Ройтман А.П.,

Члены комиссии:



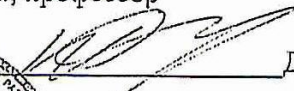
Доцент кафедры КЛД РМАПО, к.м.н.,
Ракова Н.Г.,

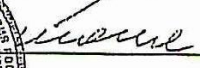


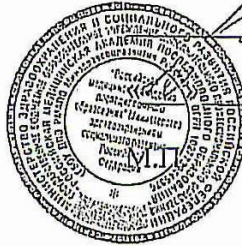
Ассистент кафедры КЛД РМАПО, к.м.н.,
Белякова А.А.,

«УТВЕРЖДАЮ»:

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России,
д.м.н., профессор


Долгов В.В.

 2012 г.



Протокол
медицинских испытаний набора реагентов ТН-ДСК-КОА
(тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных
антигенов в реакции коаггутинации), ФГУП НПО "Микроген"
Минздравсоцразвития России, Москва.

№ 102 /12 – МИ от 10.06.2011

Испытания опытных образцов набора реагентов ТН-ДСК-КОА (Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации); производства ФГУП НПО "Микроген" Минздравсоцразвития России, г. Москва, были проведены в июне 2012 года на базе филиала предприятия-производителя ФГУП НПО "Микроген", Пермское НПО «Биомед», г.Пермь с участием Испытательной лаборатории закрытого акционерного общества «Вымпел-Медцентр» (сертификат ГОСТ Р ИСО 9001:2008 (ИСО 9001:2008) № РОСС RU.ИК22.К00029 от 27.01.2011, лицензия ЛО-77-01-003539, аттестат аккредитации испытательной лаборатории № ФС 09-ПТИ-05 от 2004г.), г. Москва, и кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России. Испытания проводились согласно программе и методике медицинских испытаний.

Цель испытаний: оценка качества данных реагентов, а также оценка возможности их применения в медицинской лабораторной практике в Российской Федерации, в том числе диагностике *in vitro* при контроле иммунобиологических препаратов для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка.

Для проведения испытаний представлено:

- Два набора реагентов «ТН-ДСК-КОА», серий 4 (срок годности 02.2013) и 5 (срок годности 02.2013) с паспортами.
- Инструкция к набору реагентов «ТН-ДСК-КОА».
- Акт отбора образцов наборов реагентов «ТН-ДСК-КОА».
- Программа и методика испытаний
- Материалы для испытаний (таблицы 1-4):


Вывод:

При проведении медицинских испытаний наборов реагентов «ТН-ДСК-КОА» серий 4 и 5 (срок годности 02.2013) было проанализировано 11 положительных и 13 отрицательных образцов вакцины и очищенных анатоксинов для оценки по показателю «Подлинность»; 6 образцов вакцины и очищенных анатоксинов для оценки по показателю «Полнота сорбции»; 8 образцов очищенных анатоксинов для определения содержания антигенов. Результаты исследований показали полную межсерийную воспроизводимость и совпадение с референсными методами.

Аналитические характеристики набора реагентов «ТН-ДСК-КОА» соответствуют приведенным в инструкции. Функциональные и эксплуатационные качества набора соответствуют отечественным правилам и нормативам. Реагенты предназначены только для *in vitro* лабораторной диагностики и не контактируют с пациентом. Инструкция по применению диагностического набора полная, подробная. Реагенты удобны в обращении, требуют минимальной подготовки для анализа, маркировка четкая. Процедура выполнения анализа и интерпретации результатов легковыполнима. Противопоказаний к использованию реагентов и расходных материалов не выявлено.

Заключение: набор реагентов ТН-ДСК-КОА (Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаглютинации), производства ФГУП "НПО "Микроген" Минздравсоцразвития России, г. Москва, может быть рекомендован для использования в медицинской лабораторной практике, в том числе диагностике *in vitro* при контроле иммунобиологических препаратов для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка, в Российской Федерации.

Ассистент кафедры КЛД РМАПО,
к.м.н.,



Белякова А.А.

Приказом Росздравнадзора
от _____ 20 ____ г. № _____



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

ТН-ДСК-КОА

Тест-набор для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-набор предназначен для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коаггутинации с использованием аффинно-очищенных антител кролика против дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов, сорбированных на белке А инактивированного стафилококка штамма Cowan I.

Область применения тест-набора: контроль иммунобиологических препаратов для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Белок А стафилококка штамма Cowan I соединяется с антителами - иммуноглобулинами класса G через Fc-фрагмент (рис. 1). В результате этого специфически активные Fab-фрагменты антительной молекулы приобретают благоприятное расположение для взаимодействия с гомологичным антигеном (рис. 2).

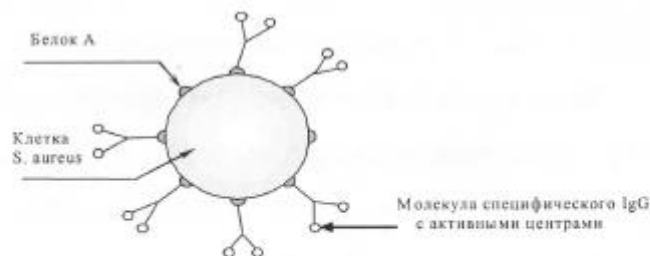


Рис. 1. Схема строения специфического КОА-диагностикума.

Конфиденциальность гарантируется
Получателем информации
Для служебного. Экз. №

УТВЕРЖДАЮ
Директор филиала
ФГУП «НПО «Микроген» Мин-
здравсоцразвития России в г Пермь
«Пермское НПО «Биомед»



А.В. Казьянин А.В. Казьянин
«26» 03 2012 г.

ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ

НА ПРОИЗВОДСТВО

**тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и
коклюшных антигенов в реакции коагутинации**

ПР № 04862997-84-12

Срок действия

до «26» 03 2014 г.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации _____

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Россия, 115088, г. Москва, ул. 1-ая Дубровская, д. 15

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

_____ (номер)

АКДС-Геп В+Ніb

Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная синтетическая

Вакцина для профилактики дифтерии, коклюша, столбняка, гепатита В и инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b
лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения в комплекте с суспензией для внутримышечного введения

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ/ТРЕТИЧНАЯ УПАКОВКА)

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177

Спецификация

АКДС-Геп В+Ніb

Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная синтетическая

лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения в комплекте с суспензией для внутримышечного введения

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия

Показатели	Методы (контроля)	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	Ніb компонент: аморфная масса белого цвета. АКДС-Геп В компонент: гомогенная суспензия белого цвета, разделяющаяся при стоянии на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого цвета, полностью разбивающийся при встряхивании. Вакцина после сведения в одну лекарственную форму - гомогенная суспензия белого цвета, разделяющаяся при стоянии на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого цвета, полностью разбивающийся при встряхивании.
Подлинность - Ніb компонент	Колориметрический с орцином	Должно наблюдаться окрашивание раствора препарата в зеленый цвет.
- дифтерийный компонент	Реакция коаггуляции (РКОА)	Должны образовываться агглютинаты со столбнячным диагностикумом.
- столбнячный компонент	Реакция коаггуляции (РКОА)	Должны образовываться агглютинаты с дифтерийным, столбнячным, коклюшным диагностикумами.
- коклюшный компонент	Иммуноферментный анализ (ИФА)	Результат реакции на определение НВsAg должен быть положительным.
- НВsAg		
Размер частиц	Визуальный, ГФ XI	Суспензия препарата, образующаяся при встряхивании, должна свободно проходить через иглу № 0840.
Время седиментационной устойчивости	Визуальный, ГФ XI	Суспензия препарата, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 2,5 мин.
Механические включения	Визуальный, ГФ XI	Видимые механические включения должны отсутствовать.

1	2	3
pH	Потенциометрический, ГФ XII	От 6,4 до 7,4
Потеря в массе при высушивании	Весовой, ГФ XI	Не более 3 %
Извлекаемый объем	ГФ XI	Не менее номинального
Стерильность	Метод прямого посева, ГФ XII	Должен быть стерильным
Пирогенность - Нib компонент	Биологический, ГФ XII	Должен быть апиrogenным
Аномальная токсичность	Биологический, ГФ XII	Должен быть нетоксичным
Специфическая безопасность	Биологический	Должен быть безопасным
Специфическая активность - Нib компонент	Биологический	Должен вызывать выработку антител не менее чем у 50 % животных (кроликов).
Содержание полирибозилрибитола фосфата (PRP)	Колориметрический с орцином	Должно быть в пределах ± 20 % от номинальной величины.
- коклюшный компонент	Биологический	Должен обладать иммуногенной активностью и содержать в 1 мл препарата:
- дифтерийный компонент		не менее 8 МЕ коклюшного компонента
- столбнячный компонент		не менее 60 международных единиц (МЕ) дифтерийного анатоксина;
		не менее 120 МЕ столбнячного анатоксина.
- HBsAg	Биологический*	Отношение дозы референс-препарата иммуногенной активности вакцины гепатита В, вызывающей выработку анти-HBs антител у 50 % мышей (ED ₅₀), к ED ₅₀ испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5.
	ИФА	Содержание HBsAg должно быть в пределах ± 15 % от номинальной величины.
Полнота сорбции:		В надосадочной жидкости препарата должно быть:
- дифтерийный компонент	РКОА	не более 1 Lf/мл дифтерийного анатоксина;
- столбнячный компонент		не более 0,1 Lf/мл столбнячного анатоксина;
- HBsAg	ИФА	не более 20 нг в 1 мл HBsAg
Формальдегид	Колориметрический	Не более 100 мкг/мл
Алюминия гидроксид (в пересчете на алюминий Al ³⁺)	Колориметрический	От 0,6 до 1,1 мг/мл

1	2	3
Производственные штаммы		<i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8 (Massachusetts) № 800013 <i>Clostridium tetani</i> № 471, № 228 <i>Bordetella pertussis</i> № 39; № 267; № 305; № 475; № 703; № 18323 <i>Pichia pastoris</i> C226 (№ MCB 120040) <i>Clostridium tetani</i> Harvard Caracas 80
Упаковка		По одной прививочной дозе Hib компонента и одной прививочной дозе (0,5 мл) АКДС-Геп В компонента в ампулы из стекла. По 5 ампул Hib компонента и по 5 ампул АКДС-ГепВ компонента в контейнер (вкладыш). Контейнер (вкладыш) вместе с инструкцией по применению в пачке из картона
Маркировка		В соответствии с ФСП
Транспортирование		При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.1248-03. Замораживание не допускается
Хранение		При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.1248-03. Замораживание не допускается
Срок годности		18 мес

*контролируют каждую пятую серий вакцины

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации _____

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Россия, 115088, г. Москва, ул. 1-ая Дубровская, д. 15

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

_____ (номер)

аАКДС-Геп В+Ніb

Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная синтетическая

Вакцина для профилактики вирусного гепатита В, дифтерии, коклюша, столбняка и инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа b
лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения в комплекте с суспензией для внутримышечного введения

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

(адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177)

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

(адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ/ТРЕТИЧНАЯ УПАКОВКА)

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

(адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

(адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177)

Спецификация

аАКДС-Геп В+Ніb

Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная синтетическая

лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения в комплекте с суспензией для внутримышечного введения

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия

Показатели	Методы контроля	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	Ніb компонент: аморфная масса белого цвета аАКДС-Геп В компонент: гомогенная суспензия белого цвета, разделяющаяся при стоянии на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого цвета, полностью разбивающийся при встряхивании Вакцина после сведения в одну лекарственную форму - гомогенная суспензия белого цвета, разделяющаяся при стоянии на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого цвета, полностью разбивающийся при встряхивании
Подлинность -Ніb компонент	Колориметрический с орцином	Должно наблюдаться окрашивание раствора в зеленый цвет
- дифтерийный компонент	Реакция коаггутинации (РКОА)	Должны образовываться агглютинаты со столбнячным диагностикумом
- столбнячный компонент	Реакция коаггутинации (РКОА)	Должны образовываться агглютинаты с дифтерийным, столбнячным, коклюшным диагностикумами
- коклюшный компонент		
- HBsAg	Иммуноферментный анализ (ИФА)	Результат реакции на определение HBsAg должен быть положительным
Размер частиц	Визуальный, ГФ XI	Суспензия, образующаяся при встряхивании, должна свободно проходить через иглу № 0840
Время седиментационной устойчивости	Визуальный, ГФ XI	Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 2,5 минут
Механические включения	Визуальный, ГФ XI	Видимые механические включения должны отсутствовать
pH	Потенциометрический, ГФ XII	От 6,4 до 7,4
Потеря в массе при высушивании	Весовой, ГФ XI	Не более 3 %

1	2	3
Извлекаемый объем	ГФ XI	Не менее номинального
Стерильность	Метод прямого посева, ГФ XII	Должен быть стерильным
Пирогенность	Биологический, ГФ XII	Должен быть апиrogenным
Аномальная токсичность	Биологический, ГФ XII	Должен быть нетоксичным
Специфическая безопасность	Биологический	Должен быть безопасным
Специфическая активность - Нib компонент - содержание полирибозилрибитола фосфата (PRP) - коклюшный компонент - дифтерийный компонент - столбнячный компонент - HBsAg	Биологический* Колориметрический с орцином Биологический Биологический* ИФА	Должен вызывать выработку антител не менее чем у 50 % животных (кроликов) Должно быть в пределах ± 20 % от номинальной величины Должен обладать иммуногенной активностью и содержать в 1 мл препарата: не менее 8 МЕ коклюшного компонента, не менее 60 международных единиц (МЕ) дифтерийного анатоксина, не менее 80 МЕ столбнячного анатоксина Отношение дозы референс-образца иммуногенной активности вакцины гепатита В, вызывающей выработку анти-HBs у 50 % мышей (ED_{50}), к ED_{50} испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5. Содержание HBsAg должно быть в пределах ± 15 % от номинальной величины
Полнота сорбции: - дифтерийный компонент - столбнячный компонент - коклюшный компонент - HBsAg	РКОА ИФА	В надосадочной жидкости должно быть: не более 1 Lf/мл неадсорбированного дифтерийного анатоксина; не более 0,1 Lf/мл неадсорбированного столбнячного анатоксина; не более 1,25 КЕ/мл** неадсорбированной вакцины коклюшной бесклеточной очищенной; не более 20 нг в 1 мл HBsAg
Формальдегид	Колориметрический	Не более 100 мкг/мл
Алюминия гидроксид (в пересчете на алюминий Al^{3+})	Комплексонометрический	От 0,6 до 1,1 мг/мл

1	2	3
Производственные штаммы		<i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8 (Massachusetts) № 800013 <i>Clostridium tetani</i> № 471, № 228 <i>Bordetella pertussis</i> № 39; № 267; № 305; № 475; № 703. <i>Pichia pastoris</i> C226 (№ MCB 120040) <i>Clostridium tetani</i> Harvard Caracas 80
Упаковка		По одной прививочной дозе Нib компонента и одной прививочной дозе (0,5 мл) аАКДС-Геп В компонента в ампулы из стекла. По 5 ампул Нib компонента и по 5 ампул аАКДС-ГепВ компонента в контейнер (вкладыш). Контейнер (вкладыш) вместе с инструкцией по применению в пачке из картона
Маркировка		В соответствии с ФСП
Транспортирование		В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается
Хранение		В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается
Срок годности		3 года

* контролируют каждую пятую серию вакцины

** условные коаггутинационные единицы

МИКРОГЕН

Федеральное государственное унитарное
предприятие «Научно-производственное
объединение по медицинским
иммунобиологическим препаратам «Микроген»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»
Ул. Братская, д.177, г. Пермь, 614089
тел. (342) 281-94-96, факс (342) 262-33-96,
e-mail: biomed@perm.microgen.ru
ИНН 7722292838, ОКПО 04862997 ОКВЭД 24.41



УТВЕРЖДАЮ
Директор филиала ФГУП «НПО
«Микроген» Минздрава России в
г. Пермь «Пермское НПО
«Биомед», д.ф.н.

Е.В.Орлова

« 5 » февраля 2014 г.

АКТ

об использовании в технологии производства комбинированных вакцин
АКДС-Геп В+Нib и аАКДС-Геп В+Нib
реакции коагутинации с использованием тест-набора «ТН-ДСК-КОА»

Комиссия в составе председателя - главного технолога, к.ф.н. Шиловой Л.Б., и членов комиссии: начальника отдела контроля качества, к.м.н. Перевозчикова А.Б., начальника отделения комбинированных вакцин, к.м.н. Пушкаревой Е.В. подтверждает акт использования результатов диссертационной работы Калашниковой Е.А. «Совершенствование системы обеспечения контроля качества комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша на основе экспрессных методов анализа» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук в процессе производства вакцинных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша. Рекомендованный автором метод контроля подлинности и полноты сорбции дифтерийного, столбнячного и коклюшного компонентов в реакции коагутинации с использованием разработанного тест-набора «ТН-ДСК-КОА» включен в проекты ФСП "Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина АКДС-Геп В+Нib)" и "Вакцина против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша бесклеточная адсорбированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая (Вакцина аАКДС-Геп В+Нib)".

Разработанный тест-набор «ТН-ДСК-КОА» по своим основным валидационным характеристикам (сходимость, воспроизводимость, чувствительность, специфичность) полностью соответствует критериям, предъявляемым ВОЗ к наборам для иммунологических испытаний, и может быть использован для оценки вакцинных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша по показателям «Подлинность» и «Полнота сорбции».

Главный технолог

Шилова Л.Б.

Начальник ОКК

Перевозчиков А.Б.

Начальник отделения комбинированных вакцин

Пушкарева Е.В.

ОКП 938882

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель
генерального директора
ФГУП НПО «Микроген»
Минздрава России



В.Ф. Руденко

с «20» ноября 2013 г.**НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ****НАБОР РЕАГЕНТОВ****«ИФА КАГ»**

**Тест-система иммуноферментная для определения
специфической активности
вакцины коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции**

Технические условия

ТУ 9388-167-14237183-2013

Введены впервые

Срок действия

с «20» ноября 2013 г.до «20» ноября 2018 г.

2013 г.

Инов. № подл.	Подпись и дата	Инов. № дубл.	Подпись и дата
---------------	----------------	---------------	----------------

«УТВЕРЖДАЮ»
 Первый заместитель
 генерального директора
 ФГУП «НПО «Микроген»
 Минздрава России



В.Ф. Руденко
 «20» ноября 2013г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«ИФА КАГ»

**Тест-система иммуноферментная для определения
 специфической активности
 вакцины коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для определения специфической активности вакцины коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции.

Область применения набора реагентов: контроль вакцины коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Метод основан на взаимодействии коклюшных антител, иммобилизованных на полистироловом планшете, с коклюшными антигенами. После фиксации на твердой фазе специфически реагирующих коклюшных антигенов не прореагировавшие компоненты системы удаляют из сферы реакции путем последовательных промывок белково-солевым раствором с детергентом. Образовавшийся комплекс антиген – антитело выявляют с помощью амплифицирующей авидин-биотиновой системы, состоящей из аффинноочищенных коклюшных антител, меченных биотином, и авидина, меченного пероксидазой хрена, которая обуславливает гидролиз

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России
в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»



«УТВЕРЖДАЮ»

Первый зам. директора филиала

Орлова Е.В.

«19» марта 2013 г.

АКТ № 2
квалификационных испытаний изделия медицинского назначения
«ИФА КАГ»

Тест-система иммуноферментная для определения специфической активности вакцины
коклюшной бесклеточной очищенной, субстанции

Комиссия в составе:

председатель – начальник ОКК Перевозчиков А.Б.,

члены комиссии - старший микробиолог ЛМТК Лузина Т.А., микробиолог ЛМТК

Пономарева Г.А., химик ПБКАЭЛ Пермякова Л.А. составили настоящий акт в том, что, в соответствии с установленным порядком постановки медицинских изделий на производство, в период с 12.03.2013 г по 15.03.2013 г вышеназванным предприятием организованы и проведены квалификационные испытания образцов указанного медицинского изделия, выпускаемого в соответствии с проектом Технических условий.





Отбор образцов для испытаний произведен 12.03.2012 г в присутствии представителей комиссии начальником ЛМТК Старцевой Н.В. в количестве 5 наборов реагентов от каждой серии (серия № 1-0213, дата изготовления 0213; серии № 2-0213, дата изготовления 0213; серии № 3-0313, дата изготовления 0313).

Квалификационные испытания отобранных образцов медицинского изделия проведены в соответствии с проектом Технических условий (см. таблицу).

Комиссия подтверждает положительные результаты проведенных квалификационных испытаний, соответствие характеристик испытанных образцов требованиям нормативного документа на медицинское изделие, наличие и законность использования предприятием-производителем конструкторской и технологической документации, полноту и стабильность технологического процесса, необходимое качество выполнения всех технологических операций, наличие системы качества производства, готовность производства к серийному выпуску медицинского изделия.

Председатель комиссии:

Члены комиссии:

 Перевозчиков А.Б.
 Лузина Т.А.
 Пономарева Г.А.
 Пермякова Л.А.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Номер реестровой записи _____

Дата включения в государственный реестр лекарственных средств для
медицинского применения « ____ » _____ 20__ г.ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России
Россия, 115088, г. Москва, ул. 1-ая Дубровская, д. 15**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**_____
(номер)**Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная**Вакцина для профилактики коклюша
*субстанция***ПРОИЗВОДИТЕЛЬ**

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Адрес производства:

Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Адрес производства:

Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Адрес производства:

Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Адрес производства:

Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177

Спецификация
Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная
субстанция

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия

Показатели	Методы (контроля)	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-желтого цвета
Подлинность	Реакция коагутинации (РКОА)	Должны образовываться агглютинаты с коклюшным диагностикумом
Механические включения	Визуальный, ГФ XI	Видимые механические включения должны отсутствовать
pH	Потенциометрический, ГФ XII	От 6,8 до 7,6
Белок	Метод Лоури без предварительного осаждения, ГФ XII	Не менее 1 мг/мл
Специфическая безопасность	Биологический	Должна быть безопасной
Дермонекротический токсин	Биологический	Должен отсутствовать
Реверсия токсичности	Биологический	Должна отсутствовать
Стерильность	Метод прямого посева, ГФ XII	Должна быть стерильной
Бактериальные эндотоксины	Хромогенный кинетический ЛАЛ-тест, ГФ XII	Не более 100 ЭЕ в вакцинной дозе 60 мкг
Специфическая активность	Иммуноферментный анализ (ИФА)	Не менее 10000 ИЕ/мл (иммуноферментные единицы)
Удельная активность	Расчетный	Не менее 1000 ИЕ на 0,1 мг белка
Формальдегид	Колориметрический	Не более 200 мкг/мл
Производственные штаммы		<i>Bordetella pertussis</i> № 39, 267, 305, 475, 703
Упаковка		По 2; 4; 6 л в бутылках вместимостью 3; 5; 10 л. Бутыль укупоривается пробкой из резины. Горловину бутылки обрачивают пергаментом или бумагой мешочной, сверху обвязывают шпагатом. Каждая серия сопровождается спутником (10 ампул по 10 мл) для проведения входного контроля. Бутыль устанавливается в деревянный ящик или в ящик из гофрированного картона и уплотняется лигнином, ватой,

Показатели	Методы (контроля)	Нормы
1	2	3
		отходами пенополистирола или другими чистыми, сухими уплотняющими материалами.
Маркировка		В соответствии с ФСП
Транспортирование		В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается
Хранение		В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается
Срок годности		3 года

МИКРОГЕН

Федеральное государственное унитарное
предприятие «Научно-производственное
объединение по медицинским
иммунобиологическим препаратам «Микроген»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»

Ул. Братская, д.177, г. Пермь, 614089

тел. (342) 281-94-96, факс (342) 262-33-96

e-mail: biomed@perm.microgen.ru

ИНН 7722292838, ОКПО 04862997 ОКВЭД 24.41

УТВЕРЖДАЮ

Директор филиала ФГУП «НПО
«Микроген» Минздрава России в
г. Пермь «Пермское НПО
«Биомед», д.ф.н.

Е.В.Орлова

« 5 » февраля 2014 г.

АКТ

об использовании в технологии производства вакцины коклюшной бесклеточной
очищенной, субстанции,
метода иммуноферментного анализа
с использованием тест-системы «ИФА КАГ»

Комиссия в составе председателя - главного технолога, к.ф.н. Шиловой Л.Б., и членов комиссии: начальника отдела контроля качества, к.м.н. Перевозчикова А.Б., начальника отделения вакцинных препаратов, к.б.н. Семенов В.Д. подтверждает акт использования результатов диссертационной работы Калашниковой Е.А. «Совершенствование системы обеспечения контроля качества комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша на основе экспрессных методов анализа» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук в процессе получения субстанции бесклеточной коклюшной вакцины. Рекомендованный автором метод контроля специфической активности с использованием разработанной иммуноферментной тест-системы «ИФА КАГ» включен в проект ФСП «Вакцина коклюшная бесклеточная очищенная, субстанция».

На основе анализа 10 экспериментально-производственных серий субстанции бесклеточной коклюшной вакцины показано, что разработанная иммуноферментная тест-система «ИФА КАГ» по своим основным валидационным характеристикам (точность, линейность, параллелизм, сходимость, воспроизводимость, чувствительность, диапазон применения, специфичность, робастность) полностью соответствует критериям, предъявляемым ВОЗ к наборам для иммунологических испытаний, и может быть использована при производстве вакцинных препаратов.

Главный технолог

Шилова Л.Б.

Начальник ОКК

Перевозчиков А.Б.

Начальник отделения вакцинных препаратов

Семенова В.Д.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-воспитательной работе
ГБОУ ВПО «Пермская государственнаяфармацевтическая академия» Минздрава России,
профессор, д.ф.н.  И.В.Алексеева

« 30 » января 2014 г.

АКТ

**внедрения результатов диссертационной работы
Калашниковой Екатерины Александровны**

на тему «Совершенствование системы обеспечения контроля качества комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша на основе экспрессных методов анализа» в учебный процесс кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии.

Объект внедрения: результаты научных исследований Е.А. Калашниковой по разработке методов контроля качества вакцинных препаратов для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша на основе реакции коагуляции и иммуноферментного анализа.

Разработчики: соискатель кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Е.А. Калашникова, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии А.М. Николаева.

Место использования: практические занятия «Принципы конструирования иммуноферментных тест-систем. Постановка твердофазного ИФА», «Методы концентрирования и очистки продукта» по курсу биотехнологии на кафедре промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ.

Пользователи: студенты 5 курса очного обучения ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ.

Когда внедрено: 2012 год.

Эффективность внедрения: материалы диссертационной работы по конструированию иммуноферментной тест-системы использованы при проведении практического занятия «Принципы конструирования иммуноферментных тест-систем. Постановка твердофазного ИФА». Целью работы является изучение наиболее распространенных методических подходов при проведении иммуноферментного анализа, при получении ферментных конъюгатов и подборе оптимальных условий твердофазного анализа; приобретение практических умений по постановке и учету иммуноферментного анализа. В задачи работы входят: определение начального разведения исследуемого материала, подбор рабочего разведения конъюгата, интерпретация полученных результатов.

Практическое занятие «Принципы конструирования иммуноферментных тест-систем. Постановка твердофазного ИФА» дает теоретические знания о принципах взаимодействия «антиген-антитело» и современных способах

получения ингредиентов тест-систем, о способах введения ферментной метки при получении конъюгатов, вырабатывает у студентов навыки по выполнению вариантов гетерогенного ИФА.

Материалы диссертационной работы по получению аффинноочищенных антител использованы при проведении лабораторной работы практического занятия «Методы концентрирования и очистки продукта». Целью лабораторной работы является изучение методов очистки белковых соединений, приобретение практических умений по аффинной хроматографии. В задачи лабораторной работы входят: получение аффинноочищенных антител, регенерация иммуносорбента, определение содержания белка спектрофотометрическим методом, анализ полученных результатов.


Практическое занятие «Методы концентрирования и очистки продукта» дает теоретические знания о современных мембранных и хроматографических методах очистки, вырабатывает у студентов навыки по применению аффинной хроматографии для выделения антител из иммунных сывороток.

Зав. кафедрой промышленной
технологии лекарств с курсом
биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА,
профессор, д.ф.н.



Е.В. Орлова

Методист курса биотехнологии
кафедры промышленной технологии
лекарств с курсом биотехнологии
ГБОУ ВПО ПГФА,
старший преподаватель, к.ф.н.

 Ю.В. Сорокина