К ВОПРОСУ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ КОНСТРУИРОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И ОЦЕНКИ ИХ СТАБИЛЬНОСТИ

*М.Е. Михайлова, Т.В. Жарникова, И.В. Жарникова, Л.В. Ляпустина, С.А. Агапитова**
ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,
**Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю*

Как показывает современный опыт, быстрые в выполнении, высокочувствительные и достоверные методы индикации и идентификации возбудителя, вызвавшего инфекционный процесс, являются основой своевременного и эффективного развертывания противоэпидемических мероприятий. Арсенал методов и средств, используемых в настоящее время для целей экспресс-диагностики, достаточно обширен, но отдельные его составляющие, безусловно, неравнозначны по таким основным параметрам, как быстрота получения конечного результата, специфичность, чувствительность и воспроизводимость.

Особую значимость при угрозе завоза и распространения опасных инфекционных болезней имеют методы диагностики (экспресс-методы), которые позволяют обнаружить возбудителя или его антигены непосредственно в пробах от больного и дать ответ в течение нескольких часов. К разряду таковых относится иммуноферментный анализ.

При постановке иммуноферментного анализа используется иммунопероксидазные конъюгаты, в состав которых входит фермент – пероксидаза хрена. Фермент имеет слабожесткую структуру и подвержен отрицательному влиянию внешних воздействий, в связи с чем срок его годности ограничен и составляет 6–12 мес., что обусловливают и низкий срок годности (до 6 мес. – жидкие, до 12 мес. – лиофилизированные препараты) тест-систем в целом, в то время как срок годности остальных компонентов тест-систем в 2–3 раза выше.

В связи с этим существует необходимость подбора условий и методов, повышающих срок годности иммунопероксидазных конъюгатов, и разработки подходов к возможной стабилизации биологической активности ферментов. При этом перспективным следует рассматривать использование процесса иммобилизации биологически активных веществ на различные матрицы. Иммобилизованные ферменты долговечны и в тысячи и десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Все это обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

Целью исследований явилось получение иммобилизованных иммунопероксидазных конъюгатов и контроль их стабильности в процессе хранения при различных температурных режимах.

В работе использовали иммуноглобулины, выделенные из гипериммунной туляремийной сыворотки (производство ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»). Конъюгацию иммуноглобулинов с ферментом пероксидазой хрена фирмы «Sigma» (США) проводили после его активирования методом перйодатного окисления по методике P.K. Nakane, A. Kawaoi. Лиофилизацию препаратов осуществляли в камере LZ-9.2 («Фригера», Чехия). Для иммобилизации ферментов в качестве твердой фазы использовали липосомы со средним размером 100 нм, полученные методом «выпаривания в обращенной фазе» из фосфолипидов, выделенных из головного мозга свиней (в возрасте 8–12 мес., порода «крупная белая»), и алюмосиликат («Нева Реактив», Россия), представляющий собой тонкодисперсный порошок, содержащий двуокись кремния и двуокись алюминия (насыпная плотность –320 кг/м^3) (ТУ 6-09-01-356-76).

Чувствительность и специфичность конъюгатов определяли по методике M. Clark, A. Adams в «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа. Учет результатов проводили на фотометре «Multiskan FC» (Финляндия).

Ранее нами была описана методика получения липосомально-пероксидазного и кремнеземно-пероксидазного конъюгатов, состоящая из следующих стадий: иммобилизация иммуноглобулинов на носитель – липосомы (алюмосиликат); активация фермента – пероксидазы хрена; конъюгация фермента с иммуноглобулинами, находящимися на носителе; очистка конъюгатов от не связавшихся компонентов, лиофилизация и контроль.

Препараты, полученные по указанной технологической схеме, были разлиты в ампулы и лиофилизированы. При оценке чувствительности иммунопероксидазных конъюгатов, сконструированных как на основе липосом, так и алюмосиликата, установлены значения 5×104-1×105 микробных клеток (м.к.)/мл туляремийного микроба при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами.

Полученные конъюгаты инкубировали при различных температурных режимах: (25±4) °С, (37±1) °С и (4±1) °С и исследовали их стабильность в процессе хранения.

Липосомальные конъюгаты показали стабильность в течение пяти лет хранения, алюмосиликатные – трех лет (срок наблюдения) при температуре хранения (4±1) °С. Наблюдения за стабильностью обоих видов конъюгатов при температурах (25±4) °С и (37±1) °С проводились в течение 2 лет, в результате чего было установлено, что конъюгаты на протяже-

нии периода наблюдения сохраняют свои рабочие характеристики (чувствительность и специфичность) и выявляют возбудитель туляремии в концентрации 5×10^4–1×10^5 м.к./мл.

В результате проведенного наблюдения было показано, что иммобилизованные иммунопероксидазные конъюгаты удовлетворяют требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам, а их стабильность превосходит аналогичный показатель традиционных иммуноферментных конъюгатов, срок годности которых не превышает 1 года.

Фиксируясь на поверхности липосом и алюмосиликата, фермент (пероксидаза хрена) резко снижает способность к конформационным изменениям структуры своих молекул под воздействием температурных факторов, изменений pH-среды и т.д., что способствует повышению стабильности и увеличению срока годности диагностических препаратов.

ОПЫТ МЕЖДУНАРОДНОГО СОТРУДНИЧЕСТВА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПРИГРАНИЧНЫХ ТЕРРИТОРИЙ

*В.Т. Смирнов, Н.Н. Жукова, И.И. Павлова, Т.П. Панамарева**
Управление Роспотребнадзора по Амурской области,
**ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Амурской области», Благовещенск*

Опыт взаимодействия санитарно-эпидемиологической службы Амурской области с санитарным карантином провинции Хэйлунцзян Китайской Народной Республики насчитывает около 20 лет.

Одним из основных направлений является взаимодействие по вопросам санитарной охраны территорий от заноса и распространения инфекционных заболеваний. Для соседних приграничных территорий особую актуальность имеют природно-очаговые инфекции, основными переносчиками которых являются грызуны.

В начале 90-х годов было подписано первое соглашение о взаимодействии с санитарным карантином Китая. Проведена большая работа, которая позволила получить первичные объективные данные о заселенности грызунами соседних территорий.

Результаты совместной работы в период 2006–2008 гг. показали, что:

– видовой состав грызунов и их эктопаразитов, иксодовых клещей, в окрестностях приграничных районов провинции Хэйлунцзян и Амурской области имеют черты сходства;

– на протяжении 3-х лет численность грызунов в окрестностях г. Благовещенска выше, чем в окрестностях г. Хэйхэ, в природных биотопах Сунькэ выше, чем в биотопах окрестностей Поярково;

– результаты лабораторных исследований на чуму и туляремию дали отрицательные результаты;

– вместе с тем, на обеих территориях подтвердилась высокая активность природных очагов ГЛПС, Лайм-боррелиоза, бартонеллеза, риккетсиоза.

В 2009–2010 гг. продолжена совместная работа по изучению заселенности грызунами приграничных территорий.

Обследование проводилось на береговых объектах, прилегающей к ним территории и в природных биотопах окрестностей приграничных территорий южных районов области – Благовещенского и Михайловского. Общая площадь обследования составила 40 км². Отработано 1500 ловушек-суток, добыто 124 экземпляра грызунов, 2 особи диких животных, 356 эктопаразитов, из них 105 иксодовых клещей, 3 гнезда грызунов.

Основной объем работ выполнен в природном биотопе Благовещенского района. Были обследованы сельскохозяйственные земли, хвойно-широколиственный и дубово-березовый лес, луга поймы р. Амура.

Численность грызунов на момент обследовательских работ была несколько ниже, чем в предыдущие годы, и колебалась в пределах 10 % в поймах рек Амура и 4–10 % на сельскохозяйственных землях.

Средний процент попаданий по всем стациям суммарно составил 7,2 %. Из семи видов грызунов, отловленных в Благовещенском районе, преобладает полевая мышь – 30 %, полевка красно-серая – 25 %.

Средний индекс обилия блох на грызунах был достаточно высоким и составил 1,3 %.

В Михайловском районе численность грызунов составила в среднем 24 % на сельскохозяйственных землях и 7 % в пойме р. Амура.

Из шести видов отловленных грызунов преобладала полевка большая восточная и полевка красно-серая. Индекс обилия высокий (2,2). Из двух видов гамазовых клещей доминировал H.ambulans (75,2 %). Индекс обилия низкий (0,2). С 6 зверьков снято 12 экземпляров личинок и нимф иксодовых клещей двух видов: D.silvarum (47,5 %) и H.concinna (52,5 %).

Численность иксодовых клещей составила в Михайловском районе 1,2 особи на 1 фл/км, в Благовещенском районе – 0,8 особи на 1 фл/км общего маршрута. В сборах зарегистрировано 3 вида клещей: I. persulcatus (47,6 %), D.silvarum (28,6 %) и H. concinna (23,8 %).

На обследуемой территории Амурской области проводилось комплексное исследование материала на иерсиниоз, листериоз, туляремию, ГЛПС, лептоспироз, клещевой энцефалит и клещевой боррелиоз серологическими, бактериологическими и молекулярно-генетическими методами.