

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07. – МР. 1764 «С». 2020.11.12. 09 ПЗ

НУБІП України

ФЕДОРЧЕНКО МАРІЇ РУСЛАНІВНИ

2021р.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 604.6 : 61

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету захисту рослин, біотехнологій та екології
ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
В.о. завідувача кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Коломієць Ю.В.

Кваско О.Л.

“ ” 2021р.

“ ” 2021р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Виробництво діагностикумів для ідентифікації інфекційних хвороб біотехнологічними методами»

Спеціальність «Біотехнології та біоінженерія»

Спеціалізація «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Магістерська програма «ДНК-паспортизація та картування геному»

Програма підготовки освітньо-наукова

Гарант освітньої програми

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

(ПІБ)

Керівник магістерської роботи
доктор сільськогосподарських наук,
професор
Кляченко О.Л.

Виконала

Федорченко М.Р.

Київ-2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

НУБІП України

ЗАТВЕРДЖУЮ
В.о. завідувача кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

Кандидат біологічних наук

Кваско О.Л.

НУБІП України

“ ” 20 р.

ЗАВДАННЯ

НУБІП України

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
СТУДЕНТУ

Федорченко Марії Русланівні

НУБІП України

Спеціальність «Біотехнології та біоінженерія»

Спеціалізація «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Магістерська програма «ДНК-паспортизація та картування геному»

НУБІП України

Програма підготовки освітньо-наукова

Тема магістерської роботи: «Виробництво діагностикумів для ідентифікації
інфекційних хвороб біотехнологічними методами» затверджена наказом

ректора НУБіП України від 12 листопада 2021 р. № 1764 “С”

НУБІП України

Термін подання завершеної роботи на кафедру « » 20 р.

Вихідні дані до магістерської роботи: літературні джерела за темою досліджень,
матеріали власних досліджень.

НУБІП України

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Провести вивчення властивостей діагностичних препаратів.
 2. Здійснити перевірку діагностикумів шляхом хімічного, біологічного контролю, молекулярно-біологічних методів, аналітично, технологічно.
- # НУБІП України

Дата видачі завдання «__» _____ 20__ р.

НУБІП України

Керівник магістерської роботи
Завдання прийняла до виконання Федорченко М.Р.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РЕФЕРАТ НУБІП України

Магістерська робота містить 70 сторінок, 6 таблиць, 10 рисунків, список літератури з 97 найменувань.

НУБІП України

Актуальність теми: успіхи сучасної медицини і сільського господарства часто залежать від того, чи вдається виявляти специфічні віруси, бактерії, гриби, паразитичні мікроорганізми, білки і низькомолекулярні сполуки в організмі людини або тварин, в рослинах, воді або ґрунті.

НУБІП України

За останні роки досить актуальною стала тема розробки і виробництва рекомбінантних препаратів та діагностикумів. Єдиною доступною на сьогоднішній день стратегією боротьби з вірусними інфекціями є своєчасна діагностика збудників для запобігання зараженню. Концепція полягає в отриманні поліклональних антисироваток та специфічних олігонуклеотидних проб для вірусів рослин та тварин та їх використанні у діагностикумах.

НУБІП України

Діагностика захворювань рослинної продукції може проводитись серологічними методами (методом імуноферментного аналізу) або молекулярними методами (методом полімеразної ланцюгової реакції). Це дозволяє визначити спектр та розповсюдженість інфекції у агроecosystemі, насінневому матеріалі, та своєчасно розробити відповідні профілактичні заходи.

НУБІП України

Небагато установ мають необхідний досвід та матеріальну базу для отримання поліклональних антисироваток та специфічних олігонуклеотидних проб до вірусів рослин з метою їх використання в діагностикумах на основі імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції. Створення діагностикумів вимагає розробки високоефективних технологій для очищення розроблюваних препаратів.

НУБІП України

НУБІП України
Мета роботи — дослідження властивостей діагностиків за їх виробництва та вивчення інноваційних методів ідентифікації інфекційних хвороб біотехнологічними методами.

НУБІП України
Завдання:
провести вивчення властивостей діагностичних препаратів
дослідити методи діагностиків

- здійснити перевірку діагностиків шляхом хімічного, біологічного контролю, молекулярно-біологічних методів, аналітично, технологічно

НУБІП України
Об'єктом дослідження — діагностичні препарати біотехнологічного виробництва.

НУБІП України
Предметом даного дослідження є дослідження властивостей діагностичних препаратів у біотехнологічному виробництві.

НУБІП України
Рік виконання роботи — 2019 – 2021.

Рік захисту роботи — 2021.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....

8

ВСТУП..... 9

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... 11

1.1. Особливості технології промислового виробництва діагностикумів..... 11

1.2. Способи розробки діагностичних сироваток для ідентифікації інфекційних хвороб..... 12

1.3. Різновиди сироваток та їх класифікація..... 13

1.4. Сучасні антимікробні препарати природного походження..... 20

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ..... 23

2.1 Реактиви та витратні матеріали..... 24

2.2 Методи приготування діагностичних сироваток для постановки реакції зв'язування комплементу..... 26

2.3 Метод виявлення антигену за допомогою люмінесцентних антітіл..... 29

2.4 Методи та прийоми контролю та оцінки стану різних діагностикумів за їх виробництва..... 33

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ..... 36

3.1. Визначення активності діагностичних сироваток..... 36

3.2 Дослідження сироваток з біологічних об'єктів і визначення антітіл (їх титрів) у специфічних сироватках за промислового виробництва..... 41

3.3. Розробка та контроль стерильності моноклональних антітіл..... 48

3.4. Дослідження властивостей молекулярної ідентифікації діагностичних засобів..... 61

3.5. Розробка біотехнологічних аспектів створення специфічних імунобіологічних препаратів направленої дії..... 64

3.6 Дослідження системи ДНК-діагностики шляхом гібридизації нуклеїнових кислот..... 68

ВИСНОВКИ..... 73

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... 75

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АГ - антиген;

АТ - антитіло;

Гем. - гемолітична сироватка (гемолізін);

КАГ - контроль антигену;

КВ - контроль вірусу;

КЕ - контроль еритроцитів;

КС - контроль сироватки;

Компл. - комплемент;

РА - реакція аглютинації;

РЗК - реакції зв'язування комплексу

РГГА - реакція гальмування гемаглютинації;

РРГА(РПГА) - реакція непрямої(пасивної) гемаглютинації;

Р-н - розчин;

РК - реакції конгломінації

РІФ - реакції імунофлуоресценції

РН - реакції нейтралізації

РЗГА - затримки гемаглютинації

РЗГАд - затримки гемадсорбції

ІФА - імуноферментний аналіз

Сиров. - сироватка;

5-АСК - кислота 5-аміносаліцилова;

С - концентрація;

Т - температура.

НУБІП України

НУБІП УКРАЇНИ

ВСТУП

Ситуація щодо епідемій у світі ніколи не була спокійною. Весь час спостерігалися спалахи інфекційних захворювань і з'являлися нові види заразних хвороб, а в останні 10 років відбувається повернення «старих» інфекцій.

Генетична мінливість циркулюючих штампів, внутрішньолікарняні інфекції, бактеріоносійство та вірусоносійство, труднощі у забезпеченні і застосуванні імунобіологічних препаратів вимагають посилення роботи в області імунопрофілактики та імунотерапії. Недостатня увага до цих проблем неминуче призводить до підйому інфекційної захворюваності.

Своєчасна та точна діагностика має вирішальне значення для глобальних зусиль із запобігання та лікування інфекційних захворювань. Тим не менш, фармакологи і медики намагаються обійтися неадекватною та застарілою

технологією тестування. Наприклад, 100-річний тест використовується для діагностики туберкульозу, хвороби, яка вбиває когось кожні 16 секунд, і нові дорогі протималарійні препарати випускаються з тією ж діагностичною неточністю, а хвороба має сотні мільйонів випадків щороку. Трагічна реальність

полягає в тому, що діагностична невизначеність спричиняє величезні втрати захворюваності та смертності. Залежність від неефективних діагностичних технологій обмежує контроль над найбільшими вбивцями світу, особливо в умовах високої поширеності вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ). Ми

стверджуємо, що необхідні інноваційні механізми для виробництва, розробки та впровадження нових та кращих інструментів діагностики інфекційних захворювань у країнах, що розвиваються, адже громадське здоров'я знаходиться під загрозою.

Профілактика і лікування, засновані на імунологічних принципах, стали вирішальним засобом зниження смертності, збільшення тривалості та поліпшення якості життя всіх вікових груп населення.

Добре відомо, що профілактика є найефективнішим і найекономічнішим способом збереження здоров'я людей.

Люди навчилися боротися з інфекціями, однак їх імунна система стала слабше реагувати на патогени і не завжди справляється з інфекційними захворюваннями.

Для імунопрофілактики та імунотерапії особливо важливі питання етики і моралі. Етичні проблеми виникають при виробництві, випробуваннях і практичному використанні препаратів. На жаль, багато етичних проблем імунопрофілактики та імунотерапії вирішуються вкрай повільно. Перш за все, це стосується питань взаємодії медичного персоналу і населення, зв'язку медичних установ з батьками і засобами масової інформації.

На сьогодні необхідно працювати над новими технологіями: модернізувати технологічні процеси у виробництві рекомбінантних препаратів, генерувати нові їх форми, працювати над технологіями глибокого культивування спорових і неспорових пробіотичних мікроорганізмів.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості технології промислового виробництва діагностиків

На основі імунологічних реакцій вченими розроблено велика кількість сучасних діагностичних систем. За допомогою яких діагностують інфекційні (ВІЛ-інфекції, грип, черевний тиф, чума, холера, хламідіоз, вірусні гепатити тощо) й неінфекційні (онкологічні, алергічні, імунопатологічні) хвороби.

Імунологічні методи діагностики специфічні, високочутливі і достовірні, тому знаходять широке застосування в екології і медицині. Діагностичні препарати відносяться до імунобіологічних препаратів, оскільки їх дія заснована на імунологічних принципах й реакціях. Саме вони та їх системи та набори широко використовують для індикації та ідентифікації бактерій, вірусів, грибів та найпростіших, діагностики інфекційних й неінфекційних хвороб, для визначення імунного статусу, алергічних й імунопатологічних розладів, імунологічної сумісності тканин, імунних взаємовідносин матері та плоду тощо.

Діагностикими застосовують для виявлення специфічних антигенів і антитіл, алергенів, сенсibiliзованих імунокомпетентних клітин, факторів природної резистентності, імунорегуляторів. Відповідно до цільового призначення діагностичних препаратів вони містять ті чи інші специфічні імунореагенти (антигени, антитіла, алергени, імуномодулятори, фактори природного імунітету тощо), які використовують для виявлення об'єкта дослідження в певних реакціях або тест-системах. Ефект реакції відповідно до характером імунореагентів і механізму реакції реєструють за фізичними (наприклад, каламутність), хімічними (наприклад, зміна кольоровості) або клінічними (симптоми і прояви) показниками [7]. До імунобіологічних препаратів належать діагностичні

препарати, так як їх дія основана на імунологічних принципах й реакціях. Діагностичні препарати, системи та набори широко застосовують для

діагностики інфекційних й неінфекційних хвороб, індикації та ідентифікації грибів, вірусів, бактерій, найпростіших, для визначення імунного статусу, алергічних й імунопатологічних розладів, імунологічної сумісності тканин, імунних взаємовідносин матері та плоду тощо (рис. 1.1)

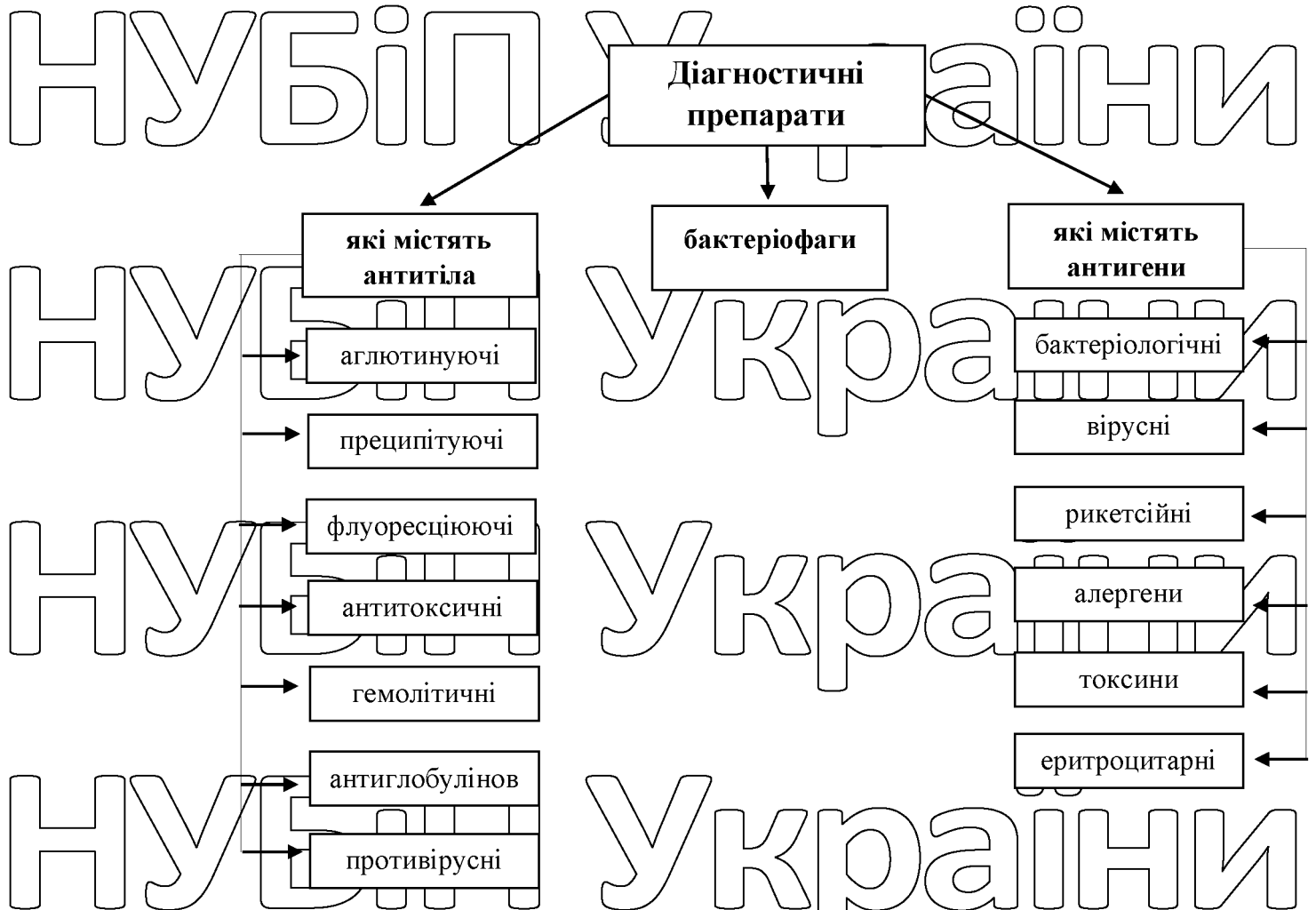


Рис. 1.1. Класифікація діагностичних препаратів[18]

1.2. Способи розробки діагностичних сироваток для ідентифікації інфекційних хвороб

До діагностичних специфічних сироваток, що застосовуються для виявлення в тих чи інших матеріалах антигенів або для визначення виду і навіть типу мікроба чи вірусу, відносяться аглютинуючі, преципітуючі і лізуючі

(комплемент зв'язуючі). Така класифікація заснована на функціональній здатності специфічних гамма-глобулінів склеювати (аглютинувати), брати в облогу (преципітувати), розчиняти (лізувати) відповідні антигени.

Для отримання імунної діагностичної сироватки кроликів імунізують повноцінними антигенами. Технологія діагностичної сироватки виготовлення залежить від типу сироваток (аглютинувальні, преципітувальні, імунофлуоресцентні та ін.) і виду антигенів. С.і. діагностичні використовують для ідентифікації збудників, як тест-сироватки в серологічних реакціях для визначення груп крові та ін. С.і. також використовуються з метою лікування (серотерапія) та профілактики (серопротекція) інфекційних захворювань[4,45].

1.3. Різновиди сироваток та їх класифікація

Аглютинуючі сироватки і технологія їх приготування. Явище аглютинації вперше виявили вчені Шарен і Роже в 1889 році. Проте тільки через кілька років цього феномену було надано діагностичне значення. У 1896 році Дурга і Грубер змогли встановити можливість використання реакції аглютинації (РА) для визначення виду мікробів, виділених кишкових інфекцій від хворих людей. у подальшому Відаль і Грюнбаум (Grunbaum A., 1897) а також зазначені вище автори, запропонували використовувати аглютинуючу здатність сироваток крові хворих для діагностики черевного тифу, для діагностики висипного тифу – Вейль і Фелікс, для діагностики бруцельозу – Райто.

У лабораторній практиці у перші роки після виявлення феномена аглютинації намітилися два напрямки його використання: визначення по задалегідь відомим імунним сироваткам виду виділеного мікроба і виявлення в досліджуваних сироватках крові хворих специфічних антитіл (аглютинінів) за допомогою відомих стандартних антигенів – суспензії убитих мікробів. Також встановлено, що не всі види мікроорганізмів в досить великій кількості здатні

викликати утворення аглістиннів. Наприклад, мікроби, що утворюють на щільних поживних середовищах колонії цювсткою форми, не утворюють гомогенну суспензію, тому вони як антигени не можуть бути використані в реакції аглютинації (збудники сибірської виразки, туберкульозу, деякі види стрептококів і інш) (рис. 1.2).



Рис.1.2. Схема серологічних реакцій [88]

Найбільш широко аглютинуючі сироватки застосовують при диференціації мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, роду *Brucella*, *Listeria*, збудників риккетсозних та вірусних інфекцій.

Аглютинуючі сироватки готують шляхом гіперімунізації тварин різними корпускулярним антигенами, введенням їх парентеральним шляхом. Як

антигенів використовують живі або вбиті різними способами культури відповідних мікробів. У зв'язку з нестабільним вмістом антигенних компонентів у одного і того ж виду бактерій тварин бажано імунізувати декількома штамми

(2-3) цього виду мікроба. Для отримання полівалентних аглютинуючих сироваток вдаються до одночасного введення суміші антигенів з декількох типів бактерій одного і того ж виду. У процесі роботи необхідно стежити за однорідністю популяції штаму, який використовується для імунізації. Крайнім способом збереження аглютинуючих властивостей є ліофільне висушування.

У якості антигенів культури мікробів рідше потрібні O-або R-варіанти. У більшості випадків для отримання повноцінних аглютинуючих сироваток використовують в S-формі. Для отримання сироваток краще використовувати в якості антигенів живі культури бактерій або вірусів, в ряді випадків для імунізації тварин використовувати знову пересіяні (добові) культури мікробів.

На щільних поживних середовищах з метою виготовлення антигенів вирощують відповідні мікроби. Якщо це ешерихії або сальмонели, то мікробний газон змивають фізіологічним розчином через 18-20 год культивування за 37° С

Для бруцелл, туляремійних бактерій терміни культивування складають 48-72 год, для лептоспор – 8-10 діб.

У ряді випадків введення живих культур може викликати важку реакцію організму імунізує тварин, і навіть їх загибель, тому, де це допустимо, тварин імунізують убитими суспензіями мікроорганізмів

За отримання аглютинуючих сироваток необхідно мати на увазі, що мікробна клітина має дуже складну антигенну структуру, котра складається з багаточисленних антигенів, розташованих в різних місцях тіла клітини (соматичні Пр- і К-антигени) і в її джгутиковому апараті (H-антигени).

O-антиген термостабільний, він створює повільно випадає зернисту або грудкувату аглютинацію, важко розбивати при струшуванні, O-аглютинуючі сироватки склеюють мікробні клітини по полюсах. При цьому рухливість у таких мікробів не втрачається (наприклад, у лептоспор та інших рухомих мікробів).

К-антигени розташовуються в тілі мікробної клітини найбільш поверхнево і повністю прикривають собою О-антигени. Це і пояснює інаглютинабельність культур, що мають К-антигени. К-антигени термолабільні і складаються з декількох фракцій (Vi, B, L, A). Мікробні клітини при К-аглютинації склеюються між собою всієї догичної поверхнею. Вважають, що глибокі соматичні або О-антигени виявляються в реакції аглютинації лише у дисоційованих штамів, які перебувають в R-формі [4,5,8,12(13)].

У рухливих джгутикових бактерій є Н-антигени. Вони термолабільні і утворюють з сироватками великий пластівчастий осад. Н-аглютинуючі сироватки склеюють бактерії джгутиками, тому вони стають нерухомими.

Всі зазначені мікробні антигени відрізняються за хімічною природою, і тому вони неоднаково чутливі до дії температури і хімічних речовин. Наприклад, якщо О-антиген не руйнується при кип'ятінні, автоклавованні і при впливі спирту, ацетону, то Н-антигени руйнуються при 2,5-годинному кип'ятінні і при обробці спиртом. Vi-антигени сальмонел руйнуються при кип'ятінні миттєво, а при 60 ° С протягом 30 хв.

У той же час поверхневі О-і К-антигени, а також джгутикові Н-антигени відносно стійкі до формаліну, що широко використовується при приготуванні формолвакцина.

Для отримання діагностичних аглютинуючих сироваток найчастіше використовують кроликів. Імунізацію в більшості випадків проводять внутрішньовенним способом в наростаючих дозах і інтервалами в 4 доби.

Зазвичай виробляють 3-4 ін'єкції антигена.

Підшкірний метод введення антигену застосовують зазвичай для первинного введення в разі підвищеної його текучості. Пробне взяття крові з метою встановлення титрів аглютининів проводять через 6-7 доби після останнього введення антигену. Отже, весь цикл імунізації триває близько місяця.

Прикладом отримання діагностичних сироваток може слугувати приготування аглютинуючих О-колі-сироваток. Як продуцентів використовують

кроликів породи шиншила вагою 3-4 кг у віці 6-12 місяців. Після закупівлі здорових кроликів витримують в карантині не менше 3-4 тижнів для виключення інфекційних захворювань та адаптації до умов фабрики. Як антигени

використовують змиви фізрозчином агарових 18-20-годних культур відповідних

сероваріантів ешерихій і підданих кип'ятінню або автоклавуванню протягом 2-

2,5 години. При цьому кожен антиген готується про запас в кількості, не обхідній на весь цикл гіперімунізації, і зберігається в холодильнику при 4-5 °С не більше

30 діб. Антиген в концентрації 2 млрд мікробних тіл в 1 мл вводиться кроликам

в крайову вушну вену з інтервалом в 3-5 діб в дозах 0,3; 0,6; 1,0; 2,0; 3,0 мл. Через

5-6 діб після останнього введення антигену у кожного кролика визначають титри

антитіл. Якщо вони відповідають інструктивним вимогам, то від кроликів беруть

тотальним способом кров, відстоюють сироватку, консервують борною

кислотою, відстоюють не менше двох місяців при температурі 4-5 °С, після чого

фільтрують через стерилізують пластини або мембранні фільтри. Перевіряють на

стерильність, розливають в ампули і піддають ліофільному сушінню. Потім

ампули запаюють під вакуумом і сироватки піддають контролю, за зовнішнім

виглядом, наявності, вакууму, вмісту вологи, розчинності, активності, і

специфічності [11, 16, 23].

З метою отримання О-сироваток імунізують кролів внутрішньовенно

прокип'яченими або спиртовими антигенами відповідних серотипів сальмонел.

Для отримання Н-сироваток кролів імунізують формалінованими антигенами,

використовуючи по можливості культури в однофазному стані по Н-антигену.

Діагностичні аглютинуючі сироватки готуються до лентоспор, лістерій,

бруцел, *Salmonella* і інших мікроорганізмів. Технологія їх виготовлення

аналогічна описаній з урахуванням окремих, особливостей в кожному

конкретному випадку, що регламентується відповідними інструкціями [4, 16, 21]

Преципітуючі сироватки і технологія їх приготування. Преципітуючі

сироватки переважно готують для діагностики сибірки. Першими для цих цілей

отримали преципітуючу сироватку Асколі і Валенти в 1910 році. Вони

імунізували внутрішньовенним способом коней слабівірulentною культурою збудника сибірської виразки. У наступні роки методи отримання якісних сироваток удосконалювалися. В даний час в нашій країні преципітуючу

сибіркову сироватку отримують шляхом внутрішньовенної імунізації коней

слабівірulentними штамми 916-1, 111-15, 94 і штамом матриксу другої вакцини Ценковського. Зазначені штами вирощуються на гороховому агарі протягом 18-20 год при 36 - 37°C. Культури відповідних штамів змивають з

поверхні горохового агару фізіологічним розчином, ретельно шуттелюють,

фільтрують і стандартизують. Коней гіперімунізують почерговим введенням

кожного із зазначених штамів внутрішньовенно. Всього роблять 16-17 ін'єкцій антигену, збільшуючи дозу з 5 до 70 мл. У період гіперімунізації роблять

контрольні дослідження на накопичення антитіл. Після закінчення

гіперімунізації кров від коней беруть через 9 - 16 діб після останнього введення

антигену з розрахунку 800 мл на 50 кг маси тварини. З крові отримують

сироватку методом її нітрування з подальшим сепаруванням і дефібринізацією плазми. Сироватку консервують 0,5% -м розчином фенолу. Потім сироватку

витримують в спеціальних відстійниках протягом двох місяців, після чого

піддають її стерилізуючій фільтрації, розливають у флакони ємністю 50-100 см³,

закривають їх гумовими пробками і обкатують алюмінієвими ковгачками. Після цього препарат піддається біологічному контролю (рис. 1.3).

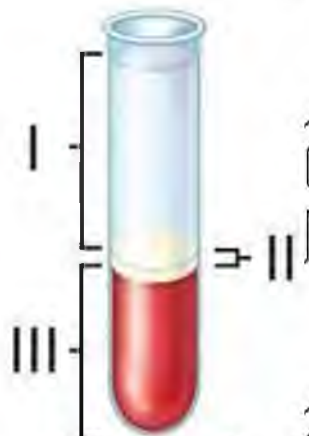


Рис. 1.3. Реакція преципітації (кільце преципітації).

НУБІП УКРАЇНИ

I – антигени;
 II – преципітаг;
 III – антитіла (сироватка) [86].

Слід зазначити, що вдосконалення отримання найбільш якісних преципітуючих сибіркових сироваток триває, так, що в ряді випадків вони мають неспецифічні властивості і дають позитивні реакції преципітації з термостабільними антигенами з *Bac. megaterium* і *Bac. anthracoides* (Мітін С. С., Кретинина А. І., Петрова Л. А., 1996). Преципітуючі сибіркові сироватки застосовують для перевірки шкіряної сировини на сибірську виразку, а також при дослідженні на сибірську виразку патологічного матеріалу, особливо з загнили трупів. Крім сибіркових преципітуючих сироваток, готують і застосовують преципітуючі діагностичні сироватки, використовувані для діагностики бруцельозу, інших бактеріальних і ряду вірусних захворювань (ящура, сказу, лейкозу, інфекційної анемії). У цих випадках реакції преципітації ставиться не в пробірках, а агаровому гелі в спеціально виштампувані в ньому луночки.

Реакції преципітації використовують в судово-медичної та ветеринарної експертизи. Технологічний принцип приготування таких преципітуючих сироваток такої ж як і преципітуючих сибіркових сироваток. Але в якості донорів найчастіше використовують кроликів. [3, 8, 16]

Антитоксичні сироватки і технологія їх приготування. Найчастіше антитоксичні сироватки готують з метою діагностики клостридозів: злоякісного набряку, інфекційної ентеротоксемії, ботулізму та інших захворювань, збудники яких утворюють сильні екзотоксини і мають безліч серологічних типів. Як антигени при отриманні таких сироваток використовують анатоксини.

Технологічним прикладом отримання таких сироваток є виготовлення антитоксичних сироваток *Cl. perfringens* типів А, В, С, D, Е і F [12, 19, 29, 41].

Як продуцентів для таких діагностичних сироваток частіше використовують валухів тонкорунних порід у віці двох років. Антигенами є очищені і концентровані анатоксини, отримані за допомогою відповідних типів

Cl. perfringens. Для кожного типу зазначеного мікроба використовують окремих

продуцентів, яких містять в окремих боксах. Антигени вівцям вводять підшкірно в зростаючих дозах з прийнятим інтервалом 4-6 доби між ін'єкціями. Гіперімунізацію тварин припиняють після отримання сироваток з активністю,

передбаченої інструкцією по її виготовленню. Тому в процесі експлуатації у продуцентів беруть кров і в її сироватці визначають титри антитоксинів.

Активність кожного типу антитоксичних сироваток встановлюють в реакції нейтралізації специфічних токсинів при введенні їх сумішей білим мишам або щурам і висловлюють її кількістю антитоксичних одиниць.

Отримання антитоксичних сироваток для діагностики інших інфекційних захворювань здійснюють за такою ж схемою. Але як продуценти можуть використовуватися інші тварини. Зрозуміло, що в схемі гіперімунізації тварин в кожному випадку є свої особливості. [16, 22]

1.4. Сучасні антимікробні препарати природного походження

Бактеріофаги представляють собою віруси, що вражають бактерії і викликають їх руйнування - лізис. Відкриття явища лізису у збудника сибірської виразки вперше зафіксував вітчизняний вчений М. Ф. Гамалія ще в 1898 році.

Однак причини такого лізису залишалися нез'ясованими. У 1915 році Творт виділив особливий фільтрівний агент, який викликав лізис колоній стафілокока.

У 1917 році Д. Еррель такий агент виділив з випорожнень хворого на важку форму бактеріальної дизентерії. Цей агент викликав розчинення культур

збудника дизентерії. Фільтрація розчищеної культури і нові додавання фільтратів до свіжих культур приводили до їх лізису. Такий стерпний з культури в культуру політично агент Д. Еррелем був названий бактеріофагом. В подальшому, в

сорокові роки, за допомогою електронного мікроскопа вдалося підтвердити, що бактеріофаг є вірусом. В даний час фаги виявлені майже у всіх патогенних і багатьох непатогенних прокаріот мікроорганізмів, у ентеробактерій,

мікобактерій, коринебактерій, стрептококів, стафілококів, сардин, спорових і актиноміцетів. Бактеріофаги широко поширені в природі. Практично вони виявляються у всіх об'єктах середовища, де живуть мікроорганізми.

Після 18-годинної інкубації на поверхні агару при наявності бактеріофага бактеріальний ріст повністю відсутній або спостерігаються округлі «стерильні плями» - колонії бактеріофага (рис. 1.4).

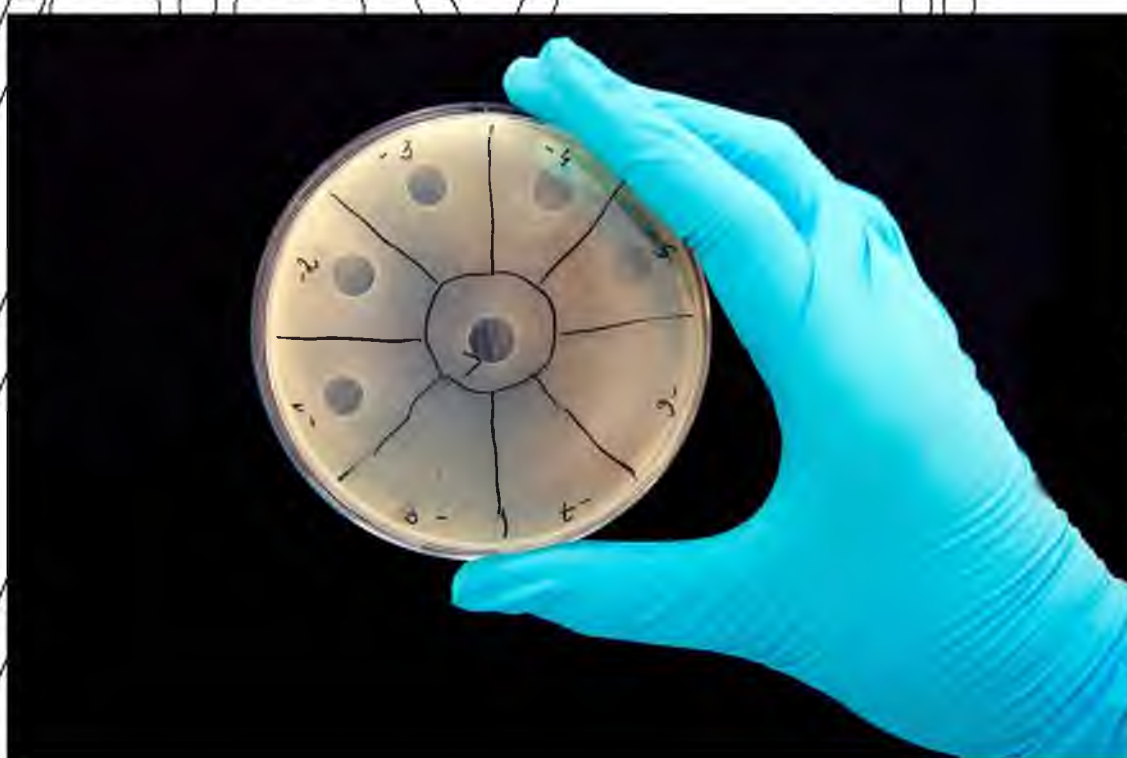


Рис 1.4. Бактеріофагова активність. Маленькі плями – область лізису бактерій, викликаного фагами. [59]

Виділені з патогенних мікроорганізмів бактеріофаги, можуть бути використані як специфічні лікувально-профілактичні біопрепарати.

Давно встановлено, що в популяції одного мікроорганізму можуть з'явитися клітини, стійкі до фагів, і з них виростають вторинні фагорезистентні мікроорганізми. Вивчаючи властивості вторинних фагорезистентних культур *Salmonella ovis*, І. К. Тутов (1961) встановив, що вони не змінюють антигенних

власливостей, але втрачають свою вірулентність. На підставі цих досліджень було доведено можливість використання вторинних фагорезистентних культур з метою виготовлення живих вакцин.

Використовуючи візуальний феномен лізису культур мікроорганізмів, специфічним бактеріофагом, в необхідних випадках його використовують як діагностичний тест. Наприклад, в бактеріологічних лабораторіях феномен бактеріофагі використовується як високоспецифічна реакція при діагностиці сибірки.

Для цієї мети біо підприємства і випускається два сибіркових бактеріофага: КВІЕВ і Гамма МВА. Для їх виготовлення використовують авірулентні штами збудника сибірки. Такі культури вирощують на МПБ або дріжджовому, бульйоні. Неодмінною умовою є те, що при засіву потрібно використовувати молоді, 5-6 годні виробничі штами збудника. Крім того, відразу після посіву штамів *B. anthracis* в бутлі вноситься бактеріофаг. Вміст бутлів перемішується. І вони ставляться в термостат на 10-18 год. Після закінчення зазначеного терміну сєреду фільтрують через стерилізують пластини або патрони. У фільтраті залишається тільки бактеріофаг. Після виготовлення бактеріофага його розливають в ампули і піддають контролю на стерильність, активність і специфічність.

Сибірковий бактеріофаг використовується як діагностикум при диференціації – збудника сибірської виразки від антракоїдів.

Приблизно за такою ж методикою готуються бактеріофаги і до інших мікроорганізмів, але вирощування їх, наприклад сальмофагов, коліфагів, проводиться протягом 6 - 10 год при 37 ° С і витримці до 24 год при кімнатній температурі. [8, 11].

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Наукові дослідження проводилися на базі ТОВ "ФЗ "Біофарма", імунобіологічної фармацевтичної компанії, провідного виробника імунобіологічних та багатьох інших лікарських засобів протягом 2018-2021 рр. Підприємство є єдиним вітчизняним виробником специфічних імуноглобулінів та органопрепаратів, отриманих шляхом застосування сучасних методів біотехнологій – генної інженерії.

Одним з інноваційних напрямком діяльності підприємства є випуск діагностичних препаратів:

- діагностикум з мікробів родини кишкових – для серологічної діагностики дизентерії і сальмонельозів,
- діагностична аглютинуюча суха сироватка – для ідентифікації сальмонел і шигел,
- діагностикум лептоспірозний еритроцитарний полівалентний рідкий – для виявлення специфічних антитіл в сироватці хворих на лептоспіроз.

Контроль діагностикумів здійснюють за допомогою:

- хімічного контролю
- біологічного контролю
 - молекулярно-біологічних методів
 - аналітично
 - технологічно

Розпочато випуск тридцяти найменувань тестових наборів для клінічної біохімії, розраховані на лабораторії з різним рівнем технічного оснащення.

Підприємство веде розробки лікарських засобів з провідними науковими центрами України.

2.1 Реактиви та витратні матеріали

У роботі використовували такі реактиви: трис- (оксиметил) -амінометан, NERES, PIPES, бромистий етидій, поліетиленгліколь з м.в. 6000, агароза, тритон X-100, 2-меркаптоетанол, дітіотреїт, бромфеноловий синій, поліетиленімін, поліакриламід, актиноміцин Д, Епіхлоргідрин, боргідрид натрію, етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль (ЕДТА), лізоцим, глутаровий альдегід фірм "Serva" (Німеччина), "Sigma" (США). Для приготування мікробіологічних середовищ використовували агар, пептони, триптон, дріжджовий екстракт, казамінові кислоти фірм "Serga" (Німеччина), "Difco" (США), "Merck" (Німеччина). ДЕАЕ-целюлоза DE-52, фосфоцеллюлоза P-II були виробництва фірми "Whatman" (Великобританія), гідроксилапатит, гепарин-сефароза фірми "Bio-Rad" (США). Білки-маркери мол.масса - фірми "Pharmacia" (Швеція) або "Serva" (Німеччина). Декстран з м.в. 500000, ДНК фага лямбда, ДНК фага T7, ДНК плезмід M13, pUC19, ендонуклеази рестрикції - виробництва НКТІ Б АВГНЦ ВБ "Вектор". Інші реактиви були вітчизняного виробництва.

Обладнання ультрасучасного рівня:

- іонний хроматограф і амінокислотний аналізатор Professional 1C

Vanò компанії Methrom (рис.2.1);



Рис.2.1. Іонний хроматограф ТОВ "ФЗ "Біофарма"

- атомно-абсорбційний спектрометр PinAAcle 900T виробництва PerkinElmer (рис.2.2)



Рис.2.2. Абсорбційний спектрометр ТОВ "ФЗ "Біофарма"

- багатофункціональний флуориметр БіоТек з автоматизованою цифровою мікроскопією SYXTATION 3 (рис. 2.3).



Рис 2.3. CYTATION 3 [91]

НУБІП України

2.2 Методи приготування діагностичних сироваток для постановки

реакції зв'язування комплементу

НУБІП України

При ряді інфекційних захворювань утворюються так звані комплемент зв'язуючі антитіла, при їх визначенні в практиці використовуються специфічні діагностичні сироватки, що містять такі антитіла. Показовим прикладом є

НУБІП України

приготування специфічних діагностичних ящурного сироваток, вірус ящура має високий ппморалізм. Він викликається одним з варіантів вірусу ящура. Ідентифікацію штаму циркулюючого вірусу ящура проводять за допомогою

НУБІП України

реакції зв'язування комплементу (РЗК). Специфічну типову і варіантну сироватки отримують від морських свинок, яких заражають вірусомісною суспензією відповідного типу, з додаванням до неї сапоніну і через 30-40 днів

НУБІП України

додадково гіперімунізують тим же матеріалом шляхом двох-чотирьох внутрішньом'язових ін'єкцій. Через 7-10 днів після останньої ін'єкції морських свинок знекровлюють і з крові готують інактивовану сироватку. Сироватку

НУБІП України

перевіряють в РЗК на активність і специфічність. В якості антигену для виготовлення сироваток використовують штами вірусу ящура, адаптовані до організму новонароджених кроленят або до культур клітин.

НУБІП України

Діагностичні комплемент зв'язуючі сироватки використовуються як контрольні при постановці РЗК на бруцельоз, сап, кампілобактеріоз, вірусні респіраторні хвороби, грип та інші бактерійні, вірусні і паразитарні інфекції.

НУБІП України

Технологічний принцип їх виготовлення той же.

НУБІП України

Слід мати на увазі, що при постановці РЗК пробіркових способом для обліку її зазвичай використовують гемолітичну (індикаторну) систему, в якій в якості специфічної використовується гемолітична сироватка (гемолізін).

НУБІП України

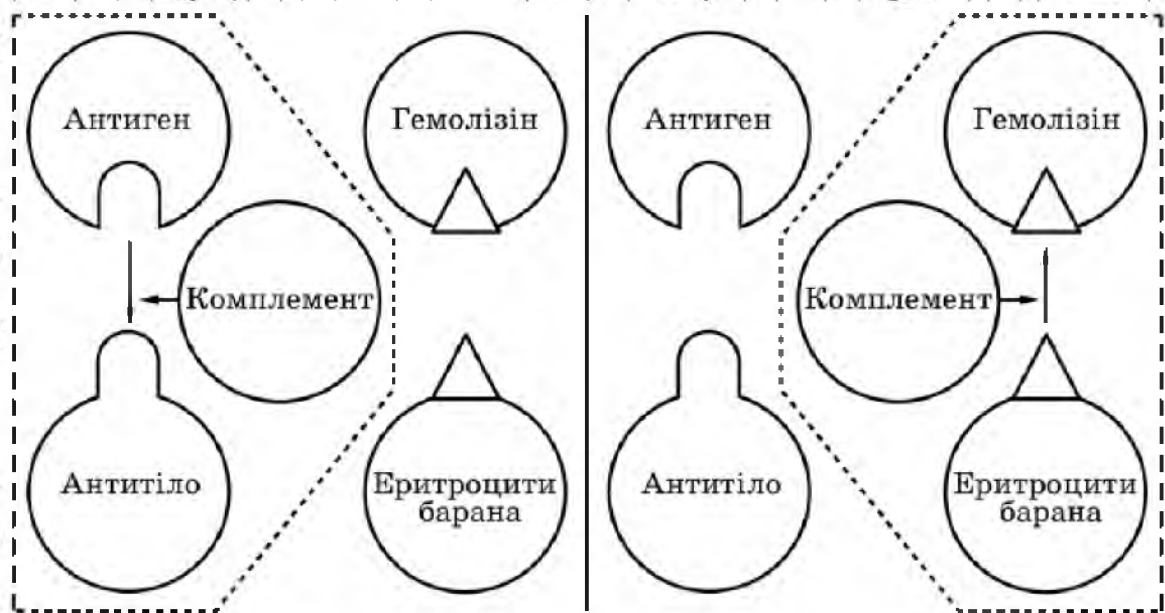
Отримується вона на біопідприємстві шляхом гіперімунізації кроликів еритроцитами баранів (валахів). Досягнення титрів гемолізіна 1: 6000 і вище дає

підстави для припинення гіперімунізації кроликів. Через 7-10 днів після останньої ін'єкції кроликам еритроцитів барана їх знекровлюють, отримують сироватку і консервують її фенолом.

При постановці РЗК неодмінною умовою є застосування в якості одного з її компонентів комплементу. Комплемент – це неспецифічний фактор гуморального імунітету, що міститься в сироватках крові теплокровних і холоднокровних тварин. Найбільш вивчений фермент морської свинки. Тому при постановці РЗК як комплемент використовують сироватку крові морських свинок. Для його отримання морських свинок вирощують в спеціальних розплідниках.

При цьому норми годівлі, утримання тварин повинні відповідати зооветеринарним вимогам. Від здорових тварин, які досягли маси 300 - 350 г, тотально з серця беруть кров, збирають її в ємності і відстоюють сироватку, яку консервують фенолом, в необхідних випадках висушують ліофільним способом і після біологічного контролю розсилають в діагностичні лабораторії.

Слід зауважити, що комплемент діє подібно ферменту на комплекс антиген - антитіло, тобто на антигени, вже пов'язані специфічними антитілами. Основна функція комплементу літуюча, руйнує антиген (рис. 2.4 та 2.5) [3,16,30].



Результат: затримка гемолізу

Результат: гемоліз

НУБІП України

Рис. 2.4. Схема РЗК за Коляковим Я. Є. [Ошибка! Источник ссылки не найден.];

1 – вірусний антиген та антитіла гомологічні, утворюються імунні комплекси, які адсорбують комплемент, і при додаванні гемолітичної системи (гемолізу та еритроцити барана) відбувається затримка гемолізу;

2 – вірусний антиген та антитіла не гомологічні і при додаванні гемолітичної системи комплемент з нею залучається в реакцію, в результаті чого відбувається гемоліз.

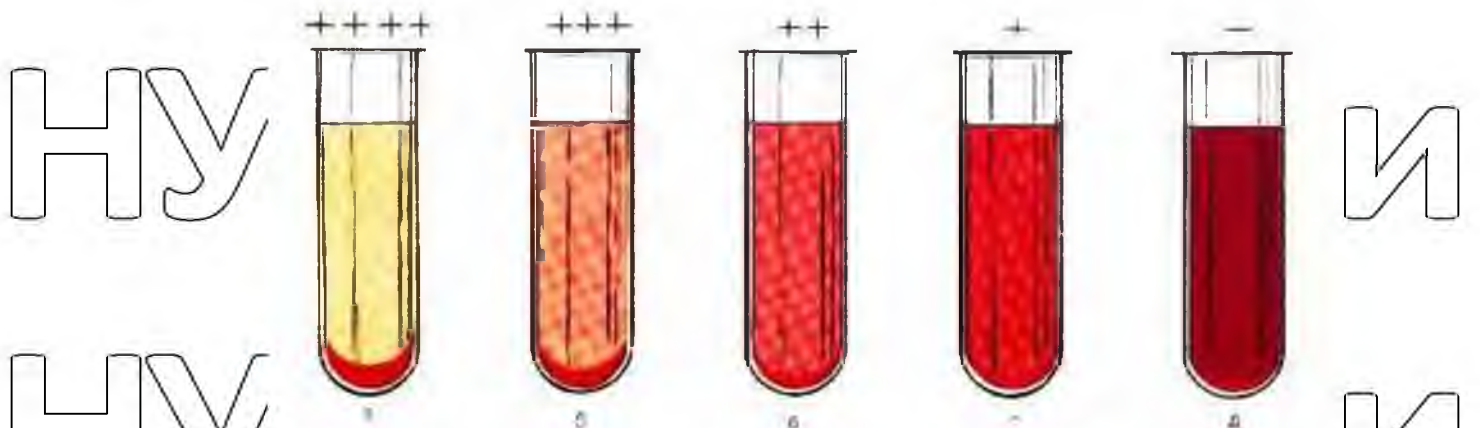


Рис. 2.5. РЗК пробірковим способом [82], - - повний гемоліз, ++++ - 100 %

затримка гемолізу.

Нелітичні властивості у комплементу виявляються при впливі його на систему антиген - антитіло, де антиген є розчинним білком або вірусом. В даному випадку має місце лише укрупнення імунного комплексу. Це відбувається в реакції конглютинації (РК), в якій використовують нелітичні або слаболітичні компоненти коней, свиней, але не морської свинки. [6,7,9,12]

2.3 Метод виявлення антигену за допомогою люмінесцентних антитіл

Метод виявлення антигену за допомогою люмінесцентних антитіл був вперше запропонований А. Кунсом в 1942 році. Це дозволило побачити під люмінесцентним мікроскопом реакцію антиген - антитіло. Суть методу полягає в тому, що за відомими антитілами, міченими флуорохромом, визначають невідомий антиген. Деякі флуоресцентні барвники (флуоресцеїнізоціаната, флуоресцеїнізотіоціаната, диметіламінонафталінсульфанілхлорид і інші), не порушуючи специфічності антитіл, мають здатність вступати в хімічну зв'язок з ними. Таке мічене антитіло з'єднується зі специфічним антигеном, утворюючи при цьому конгломерати, що світяться яскраво-зеленим або зелено-жовтим світлом при люмінесцентній мікроскопії. Реакції такого типу називаються реакціями імунофлуоресценції (РІФ). В даний час відомі методи прямих і непрямих РІФ.

Метод прямої РІФ був розроблений Кунсом і Кацланом. Гомологічне антитіло, кон'юговане флуоресцентним барвником, з'єднується з антигеном. В результаті утворюється флуоресціюючий комплекс антиген - антитіло.

Методи непрямой РІФ включають три варіанти:

1) Метод непрямой флуорохромування антитіл. Запропоновано Веллером і Кунсом. Він заснований на кон'югуванні флуоресцентним барвником анти-антитіл і називається ще антигамма-глобуліновим методом. Кон'юговані флуорохромом анти-антитіла (антигамма-глобуліни) наносяться на заздалегідь приготований комплекс антиген-антитіло. Результатом є утворення флуоресціюючого комплексу антиген - антитіло - анти-антитіло.

2) Метод прямого флуорохромування комплексу. Запропоновано Голдвассером і Шепардом, а потім Клейном і Буркхолдером. Антиген зв'язується з гомологічним антитілом. На комплекс антиген - антитіло наносять кон'югований флуорохромом компонент. Останній, володіючи здатністю адсорбуватися на комплексі антиген-антитіло, зв'язується з таким комплексом.

НУБІП УКРАЇНИ

Під люмінесцентним мікроскопом виявляють флуоресцюючий комплекс антиген - антитіло - комплемент. Цей метод надзвичайно чутливий і має перевагу перед методом зв'язування комплементу в гемолітичній системі.

3) Метод непрямого флуорохромування комплементу, або антикомплемента́рний метод, запропонований Мюллером. На комплекс антиген - антитіло - комплемент наносити кон'югований флуорохромом антикомплемента́рний метод. Останній готують шляхом гіперімунізації кроликів сироваткою крові морської свинки (комплемента́рний метод). Під люмінесцентним мікроскопом виявляють флуоресцюючий комплекс антиген - антитіло - комплемент антикомплемента́рний метод.

НУБІП УКРАЇНИ

Даний метод також є високочутливим. Незважаючи на високу чутливість непрямих методів РІФ, в практиці найбільш часто використовується прямий і антигамма-глобулінові методи РІФ.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

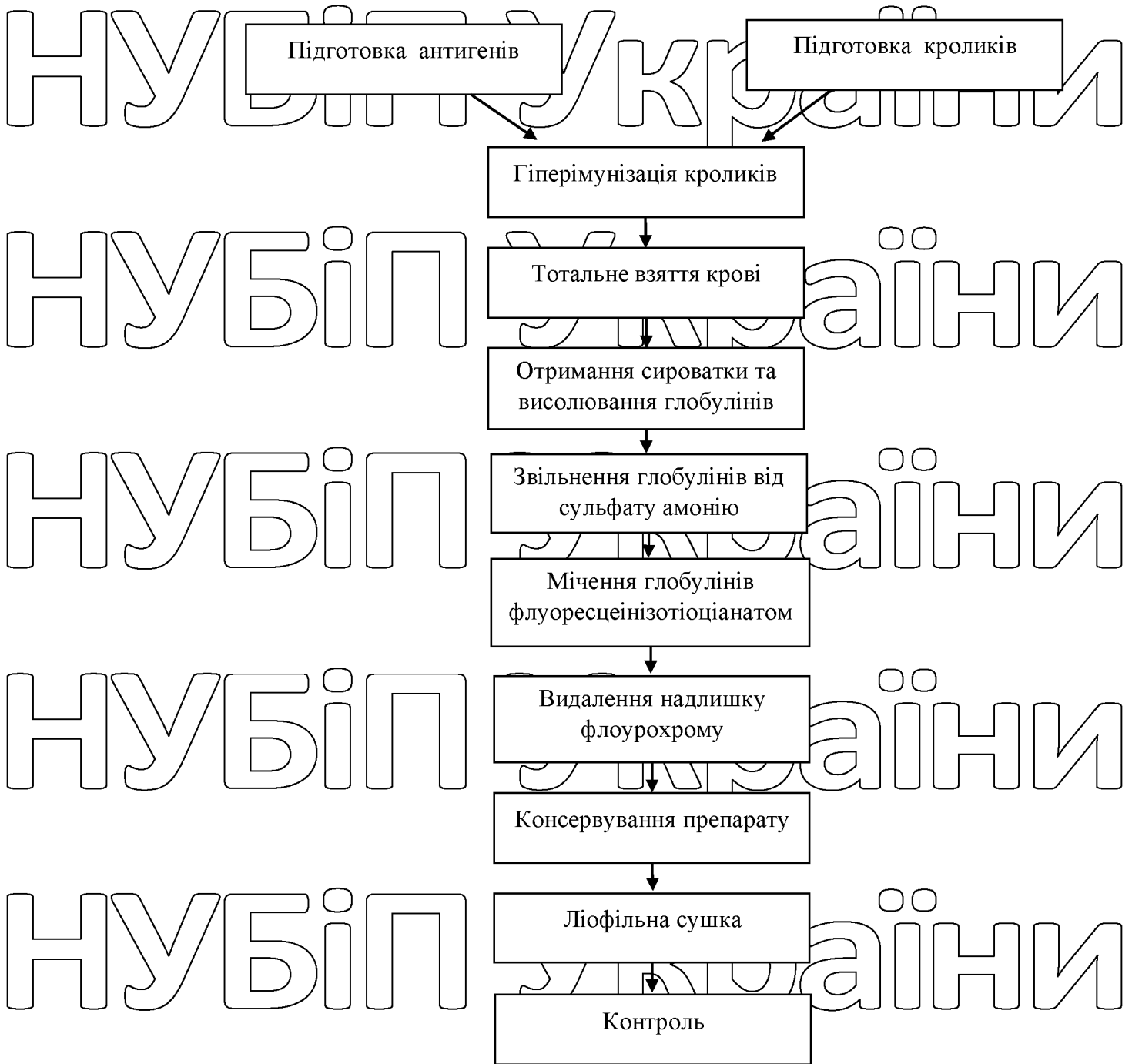


Рис. 2.7 Процес підготовки діагностичних сироваток в біопромисловості

Ці методи використовуються для швидкої і точної діагностики сказу, орнітозу, поліомієліту, сибірської виразки, сальмонельозів, кампілобактеріозу і ряду інших інфекцій. Технологічним прикладом приготування флуоресціюючих сироваток є флуоресцируючі сальмонельозні О-сироватки. Такі сироватки призначені для прискореного виявлення сальмонел в патологічному матеріалі,

продуктах забою тварин, кормах, об'єктах зовнішнього середовища. Для їх виробництва в якості донорів використовують кроликів. Їх імунізують багатократно формалінованими антигенами з сальмонел. Від кроликів отримують сироватку крові з титром аглютининів не нижче 1: 6400 - 1: 12 800.

Сироватки адсорбують концентрованою масою сальмонел для видалення всіх гетерологічних аглютининів. Аглютинати видаляють із сироватки центрифугуванням. З адсорбованої сироватки беруть в облогу глобуліни сульфатом амонію. Для очищення глобулінів від сульфату амонію проводять

діаліз проти фізіологічного розчину. Очищений глобулін мітять флуоресценціозіоціанатом. Надлишок флуорохромів видаляють шляхом пропускання мічених глобулінів через колонку сефадексом. Мічені глобуліни консервують мертиоляту, розливають в ампули, ліофілізують і здають на контроль. При цьому такі флуоресцируючі O-сироватки (глобуліни) перевіряють

на активність (фарбувальний титр) на добових агарових культурах сальмонел і на специфічність на добових культурах сальмонел і ешерихій.

Крім зазначених діагностичних сироваток, в біопромисловості також готуються гіперімунні сироватки з метою використання їх в реакціях нейтралізації (РН), затримки гемагглютинації (РЗГА), затримки гемадсорбції (РЗГАд), імуноферментного аналізу (ІФА) та інших. Всі вони виходять шляхом гіперімунізації кроликів відповідними антигенами. [1,9,16,20]

НУБІП України

НУБІП України

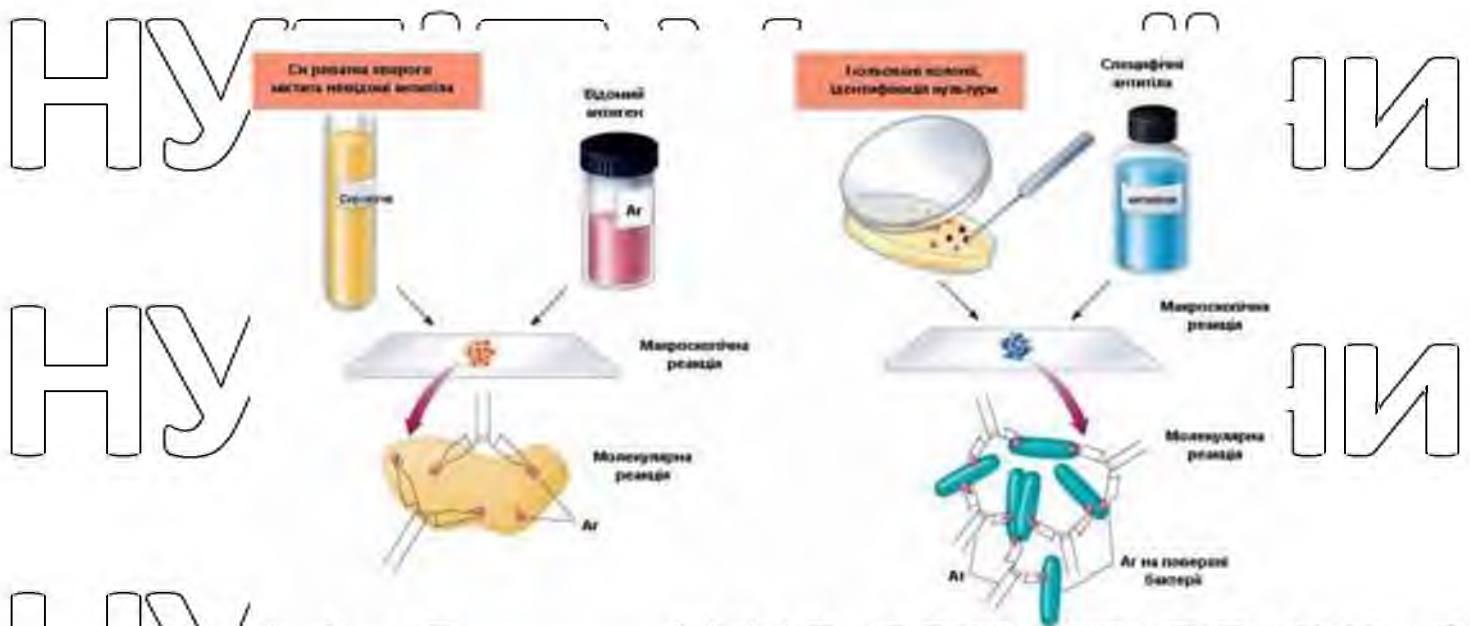


Рис. 2.8 Схеми приготування флуоресціюючих сироваток. [45]

2.4 Методи та прийоми контролю та оцінки стану різних

діагностикумів за їх виробництва

Для перевірки стерильності діагностикумів, накопичення і збереження, а також для вивчення їх різноманітних біологічних властивостей необхідно мати відповідні живильні середовища.

Такі середовища повинні містити не тільки потрібні для патогенів поживні речовини, але й при підборі середовищ доводиться брати до уваги не тільки вимоги бактерій до певних джерел живлення для підтримки їх життєдіяльності, а й можливість здійснювати обмін між клітиною мікроба і навколишнім середовищем.

Живильні середовища повинні мати такі, необхідні для бактерій елементи живлення – Азот, Вуглець, Фосфор, Сірку, зольні елементи, а також додаткові речовини типу вітамінів, різних факторів росту, амінокислоти тощо. При розробці складу живильних середовищ слід враховувати також і форму хімічних сполук, які будуть використані бактеріями для побудови їх тіла і підтримки життєдіяльності та крім елементів живлення велике значення має вологість.

осмотичний тиск середовища, її кислотність (рН), окислювально-відновний потенціал, температура, аерація і т.д.

Для приготування поживних середовищ рекомендується застосовувати водопровідну воду. У разі проведення спеціальних робіт краще використовувати дистильовану воду і хімічно чисті реактиви [14].

Середовища діляться на природні і штучні. До природним відносяться овочі, фрукти, їх відвари, молоко, що містить різні органічні речовини. Склад середовищ залежить не тільки від природи сировини, але і від тих умов, в яких відбувається синтез цих речовин, в зв'язку з чим склад таких середовищ не є постійним. Штучні ж середовища, що складаються з строго певних хімічних речовин і називаються синтетичними, мають вже цілком постійний склад.

У деяких випадках до таких середовищ для кращого росту бактерій додають незначну кількість вітамінів, факторів росту і різні витяжки з природних продуктів.

Відомі й так звані елективні середовища, складені з таким розрахунком, щоб вони забезпечували розвиток одного або групи родичних мікробів і були мало придатні або зовсім непридатні для розвитку інших. Ці середовища зазвичай застосовуються для виділення мікробів з місць їх природного проживання, де є багато сторонніх форм мікроорганізмів [5,7,9].

Етапи приготування живильного середовища:

Зважування: зважують певну вагу компонентів живильного середовища на аналітичних вагах; розчинення: компоненти живильного середовища розчиняють в попередньо нагрітій до 70°C дистильованої воді. Розчини макро- і мікросолей готують окремо. Розчини фосфатів, що входять до складу, макросолей також готують окремо, так як в процесі стерилізації в автоклаві вони випадають в осад і надалі знову вимагають розчинення; кип'ятіння: розчини поживних середовищ кип'ятять на водяній бані протягом 2 хв; встановлення рН: орієнтовно встановлюють за допомогою індикаторного паперу, для точного визначення користуються потенціометром. При стерилізації рН знижується на

0,2, тому спочатку готують більш густий розчин; фільтрація рідких і розплавлених шільних середовищ проводять через валегий паперовий або матерчатий фільтри. Фільтрація агарових середовищ утруднена - вони швидко

застигають. Зазвичай їх фільтрують через ватно-марлевий фільтр; розлив

середовищ. живильні середовища розливають не більше ніж на $\frac{1}{4}$ ємності, так як

при стерилізації можуть намокнути пробки і середовища втратять стерильність;

стерилізація: для стерилізації живильних середовищ використовують термічний

спосіб: стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування), подрібнена

стерилізація (тиндалізація), кип'ятіння. Режим стерилізації залежить від складу

середовища і вказано в її рецепті. При автоклавуванні 3-5% рідини втрачається в

результаті випаровування, тому рекомендується в готові середовища додавати

понад обсяг приблизно 5% дистильованої води. Тоді після стерилізації

середовище буде мати необхідну концентрацію.

Контроль:

- для контролю стерильності середовища ставлять на 2 доби в термостат, після чого їх переглядають.

- хімічний контроль остаточно встановлює рН, вміст загального та амінного азоту, пептона, хлоридів.

- для біологічного контролю кілька зразків середовища засівають спеціально підібраними культурами, і по їх зростанню судять про живильні властивості середовища.

Для культивування використовуються МПА, МПБ з глюкозою, МППБ під маслом, агар-Сабуро, середовище Чапека, картопляно-глюкозний агар. Всі компоненти фільтрують, доводячи до 1 л водою, розчиняють глюкозу і при нагріванні розливають в пробірки і стерилізують при 1 атм 10 хв [1,10,13].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У нашому дослідженні були використані наступні діагностичні препарати: діагностикум з мікроорганізмів родини кишкових – для серологічної діагностики дизентерії і сальмонельозів, діагностикум лептоспірозний еритроцитарний полівалентний рідкий – для виявлення специфічних антитіл в сироватці хворих на лептоспіроз, діагностична аглютинуюча сума сироватка – для ідентифікації сальмонел і шигел.

Контроль досліджуваних діагностикумів здійснювали за допомогою: біологічного контролю, хімічного контролю, молекулярно-біологічних методів, технологічно, аналітично.

3.1. Визначення активності діагностичних сироваток

На всіх етапах виробництва сироваток проводили контроль за їх якістю. Кожна серія сироваток після виробничого контролю надходила до відділу біологічного та технологічного контролю, де перевіряли її фізичні властивості, стерильність, нешкідливість, специфічну активність після 20-добової витримки при 37 °С, також визначали вміст у сироватці водневих іонів (рН), білка, апрогенність, залишковий вміст солей, електрофоретичну чистоту та інші показники.

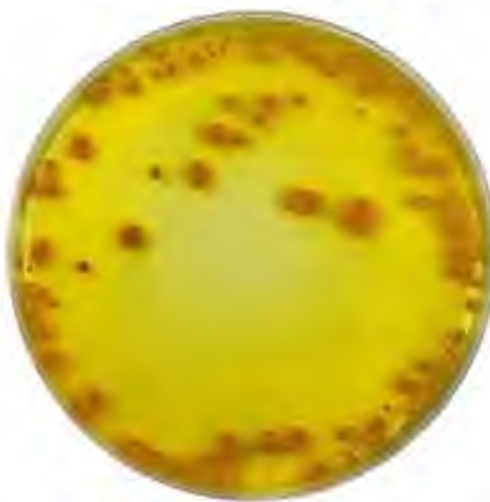


Рис. 3.1. Контроль діагностикуму – контаміноване МПА (фото автора)

Фізичні характеристики сироваток визначали візуально. Наприклад нативна сироватка зобов'язана мати легку опалесценцію або бути прозорою.

Дозволяється утворення невеликого осаду, легко розчинного у рівномірну суспензію, яка повинна бути без ознак підвищеної в'язкості. Суха сироватка зобов'язана легко розчинятися впродовж 1-2 хв та мати певний відсоток вологості (не більше 6%).

Контроль на стерильність сироватки здійснювали шляхом висіву її на середовища для виключення контамінації бактеріями (МПА, МПБ з глюкозою, МППБ під маслом) мікроскопічними грибами (середовища Чапека і агар Сабуро) (рис. 3.1, 3.2).



Рис. 3.2 Використані набори комерційних середовища для перевірки діагностикумів на контамінацію, ТОВ "ФЗ "Біофарма"

На морських свинках масою по 300 - 400 г проводили перевірку сироваток на нешкідливість, коли їм підшкірно вводили 10 мл сироватки по 5 мл з двох сторін. Інколи для цих цілей використовують кроликів, тварини, котрі отримали сироватку, повинні лишатися здоровими, не мати помітних місцевих або загальних реакцій протягом тижневого спостереження. Якщо такі зміни присутні, то контроль повторюють на подвійному числі тварин. Вся серія

препарату бракується при повторному незадовільному результаті контролю на нешкідливість.

В реакції аглютинації або нейтралізації встановлювали активність деяких інших сироваток, а активність протилептоспіротної сироватки визначали в реакції мікроаглютинації (РМА) шляхом розведення сироватки від 1:1000 до 1:100000. В якості антигену застосовували живі культури лептоспори всіх серологічних груп, якими імунізували тварин. Сироватку вважають активною при позитивній РМА в два хреста в розведенні 1: 25 000 і вище з лептоспірозом кожної групи (рис.3.3).

Визначення активності антитоксичних сироваток проти анаеробних інфекцій проводили в реакції нейтралізації специфічних токсинів на білих мишах масою 16-18 грамів. Активність сироватки зазвичай висловлюють антитоксичними одиницями (АЕ). Розрахунок кількості АЕ в 1 мл сироватки проводять за стандартом.

Активність антитоксичних сироваток *Cl. Perfringens* різних типів, застосовуваних для діагностики хвороб тварин, що викликаються *Cl. Perfringens*, зобов'язана бути не нижче наступних показників: тип А – 20 АО, тип С – 40 АО, тип D – 100 АО і тип Е – 20 АО.

В пробіркових РА і на склі з відповідними стандартними антигенами з убитих мікроорганізмів встановлюють активність діагностичних аглютинуючих сироваток (наприклад, аглютинуючі О-колі сироватки, монорецепторні і сальмонельозні О- і Н- аглютинуючі сироватки) Активність діагностичних аглютинуючих сироваток (наприклад, сальмонельозні і монорецепторні О- і Н- аглютинуючі сироватки, аглютинуючі О-колі сироватки) визначають в пробіркових РА і на склі з відповідними стандартними антигенами з убитих мікроорганізмів. Специфічність діагностичних сироваток визначають в РА з гетерологічними культурами мікроорганізмів, які не мають антигенних родинних зв'язків, і культурами однієї / двох серогруп мікроорганізмів, споріднених за антигенним складом.

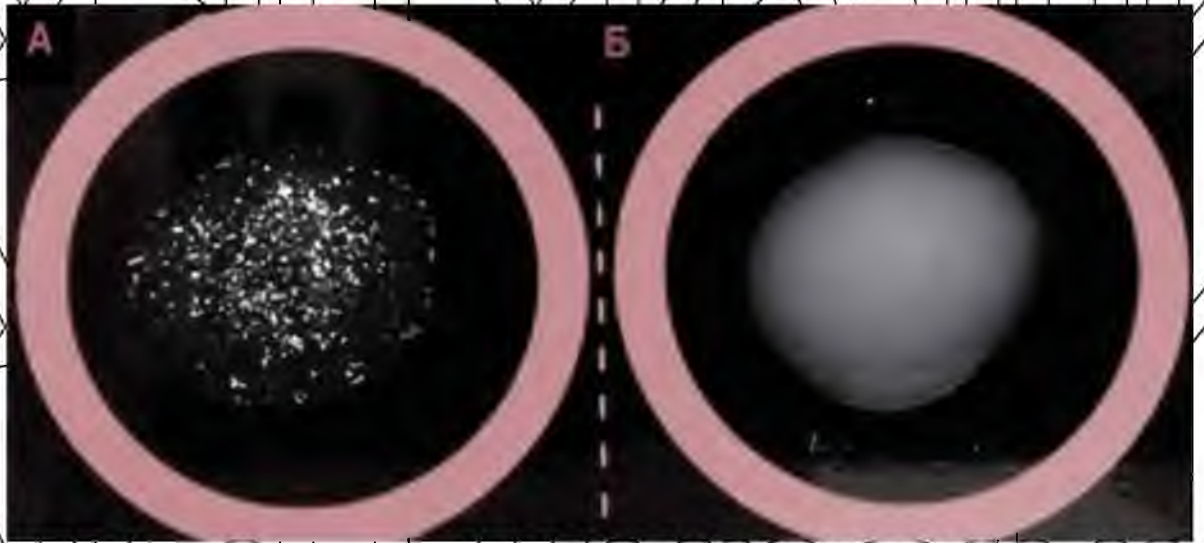


Рис.3.3 Активність діагностичних аглютинуючих сироваток: позитивна (А) та негативна (В) реакції якісного тесту (ТОВ "ФЗ "Біофарма")

На рис. 3.4 зображено модель та аналіз чутливості реакції бактеріальної аглютинації (А) та обчислювальне математичне моделювання реакції бактеріальної аглютинації для концентрацій аналіту tdGFP. Вісь Y представляє кінцеву точку нормалізованого значення аглютинації клітин ($1 - \tilde{N}$) для кожної концентрації аналіту, коли систему розв'язують чисельно протягом 18 год.



[tdGFP] difference/ nM

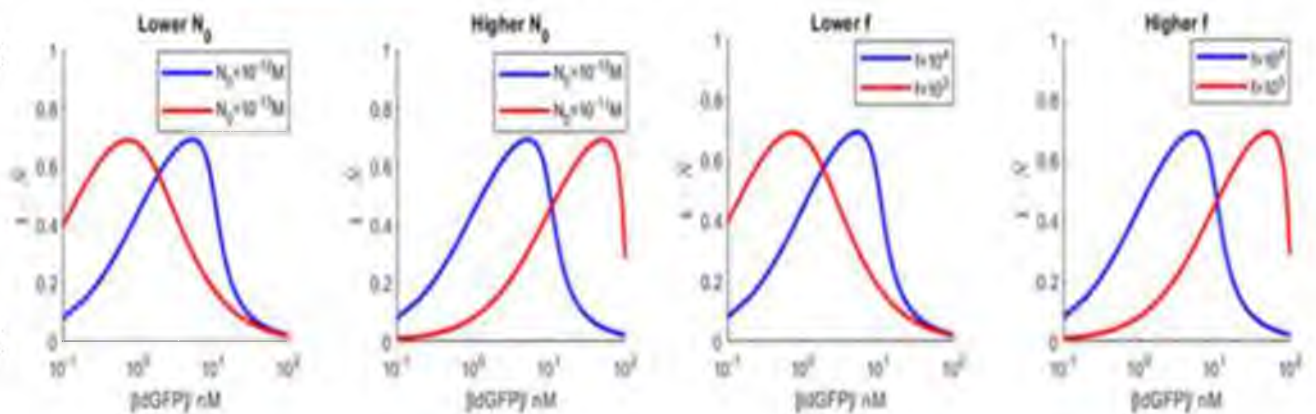


Рис.3.4. Аналіз чутливості реакції бактеріальної аглютинації

Червоні пунктирні лінії вказують на максимальну та мінімальну концентрації tdGFP (1,75-14 нМ), де спостерігалася аглютинація клітин в експериментальному

аналізі (зображення аналізу на планшеті в нижній частині графіка, де зразки, позитивні на аглютинацію, позначені червоним прямокутником) (B) Гістограма

зміни концентрації аналіту tdGFP, при якій спостерігається максимальна нормалізована аглютинація клітин після збурення параметра від їх номінальних

значень до 10-кратного вишого (+) або нижчого (-). Параметри (зверху вниз):

нормована константа швидкості аглютинації (C_{1n}), константа швидкості

зв'язування нанотіл (C_{2}), константа швидкості дисоціації нанотіла (C_{3}),

початкова концентрація клітин (N_0) і кількість нанотіл на клітинку (f). (C)

Моделювання реакції аглютинації при 10-кратно меншій або в 10-кратно вищій

концентрації бактеріальних клітин (N_0) або нанотіла на клітинку (f) (червона крива) відносно базової моделі (синя крива).

Із застосуванням люмінесцентного мікроскопа встановлювали

специфічність і активність флуоресціюючих сибіркових, сальмонельозних та

інших сироваток (рис.3.5).

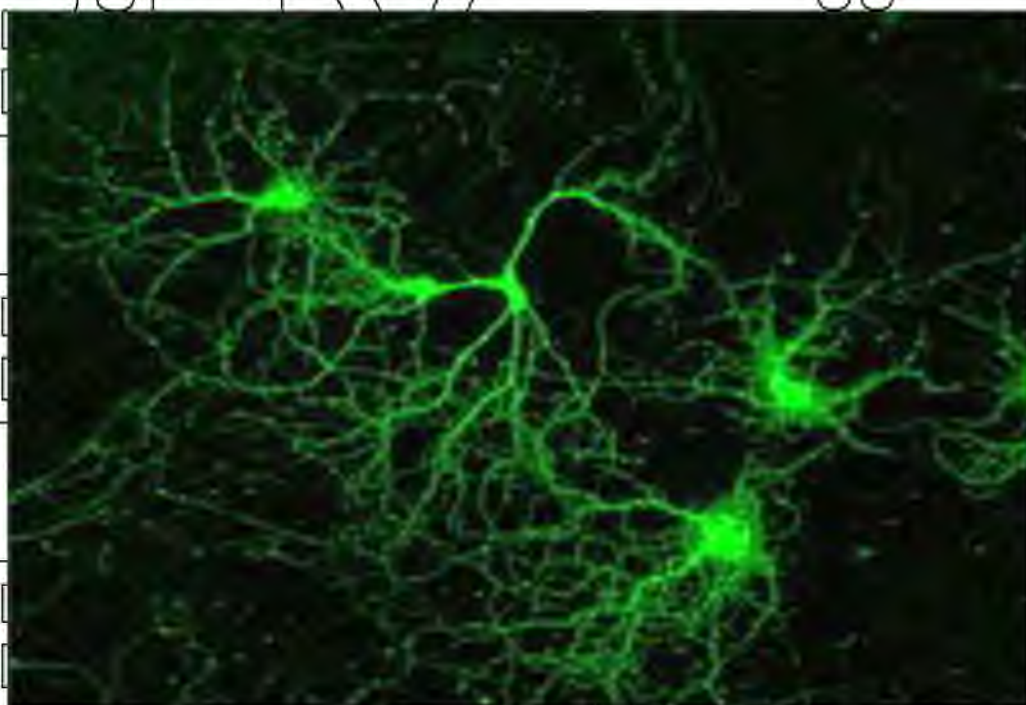


Рис. 3.5. Флуоресціююча активність сальмонельозної сироватки (лабораторія ТОВ "Ф3 "Біофарма")

З добових агарових культур відповідних гетерологічних та гомологічних мікроорганізмів (годували мазки і обробляли їх випробуваною флуоресціюючою сироваткою. Препарат переглядали під люмінесцентним мікроскопом. При цьому спостерігалось світіння гомологічних мікробів, а світіння гетерологічних мікробів було відсутнє. Електрофоретичними методами встановлювали чистоту білкових фракцій сироваткових препаратів.

Перевірку на апірогенність лікувально-профілактичних сироваток здійснювали на трьох кроликах масою 1,5-2 кг, до експерименту їх щодня

зважували на протязі трьох діб і визначали температуру тіла, яка була в межах

38,6-39,8 °С. Напередодні досліду, ввечері, у кроликів, забирали залишки корму і їх не годували. Випробувану сироватку підігрівали до 37 °С та вводили внутрішньовенно в крайову вушну вену в дозі 1 мл/кг маси. Через одну, дві і три

годи після введення сироватки у кроликів вимірювали температуру тіла. Вона не

мусить підвищуватися більш ніж на 0,8 °С. Після виконання контролю

сироваток на кожну серію складався паспорт, в якому зазначались основні специфічні, технологічні та лікувально-профілактичні показники, а для діагностичних сироваток ще і титр антитіл в РД, РЗК, РН, ІФА, РГГА, РІФ та

інших реакціях. У паспортах (інструкціях) обов'язково вказувалось умови і терміни зберігання.

3.2 Дослідження сироваток з біологічних об'єктів і визначення

антитіл (їх титрів) у специфічних сироватках за промислового

виробництва

У промисловому виробництві за допомогою антигенів-діагностиків виконувалися дослідження сироваток інфікованих тварин на присутність у їх організмі антитіл, а також визначення титрів цих антитіл у специфічних сироватках. За походженням ці антигени поділяють: бактеріальні, вірусні, рикетсійні.

Підготовка діагностиків пов'язана з ретельним приготуванням і відбором і селекцією штамів мікроорганізмів, з яких вони продукуються.

Виробничі штами бактерій зберігаються у S формі, що може забезпечити їм високу специфічність та аглютинабельність, з подальшим утворенням стійкої

однорідної суспензії. У розробці діагностиків майже всі штами мікроорганізмів найчастіше вирощували на твердих (агарових) середовищах.

Культуру змивали з поверхні агару, після чого їх інактивували 1 % борною кислотою (коли-антигени, сальмонельозні, лістеріозний), 0,5 % формаліну

(бруцельозний антиген, туляремійний), піддавали помірно високим температурам (бруцельозний антиген).

Виходячи з наших знань і уявлень про об'єктивно існуючій різноманітності антигенної структури збудників інфекційних хвороб, у

виробництві біологічних препаратів можна одержувати різні діагностикими. З клісних клітин ми приготували діагностикими з бактерій, котрі мали свою

антигенну відособленість. В інших випадках діагностикими мали антигени, де переважали окремі структурні складові. До прикладу, від бактерій кишкової

групи методом селекції штамів і їх обробки відповідними агентами одержували H, Vi, та O-діагностикими, O-діагностикими готували з нерухомих культур,

одержаних за культивування на твердих живильних середовищах і оброблених перед тим гліцеринем чи еспиртом. Сальмонельозні H-монодіагностикими ми

готували з агарових і бульйонних культур шляхом додавання до них формаліну не більше 0,2 % у концентрації. Найскладніше нам виходило готувати Vi-

антиген, оскільки останній володіє низькою стійкістю на різні подразники. Ми готували компонент з поверхневих складових мікробних клітин далі

консервували формаліном, перед формалізацією ще стабілізували 25 % хлоридом кальцію.

Відомо, що антигени можуть бути розчинними та корпускулярними (цілі клітини). Корпускулярні антигени є суспензією інактивованих (вбитих), інколи живих бактерій у фізрозчині та певною концентрацією консерванту. Далі антигени піддавали очищенню. Їх застосовували для постановки РЗК, РТЗК, РА.

Прикладом одержання корпускулярного антигену є виготовлення лістеріозного антигену УНПЕВ для РЗК з виробничих штамів лістерій двох серогруп (2 штами на серологічну групу).

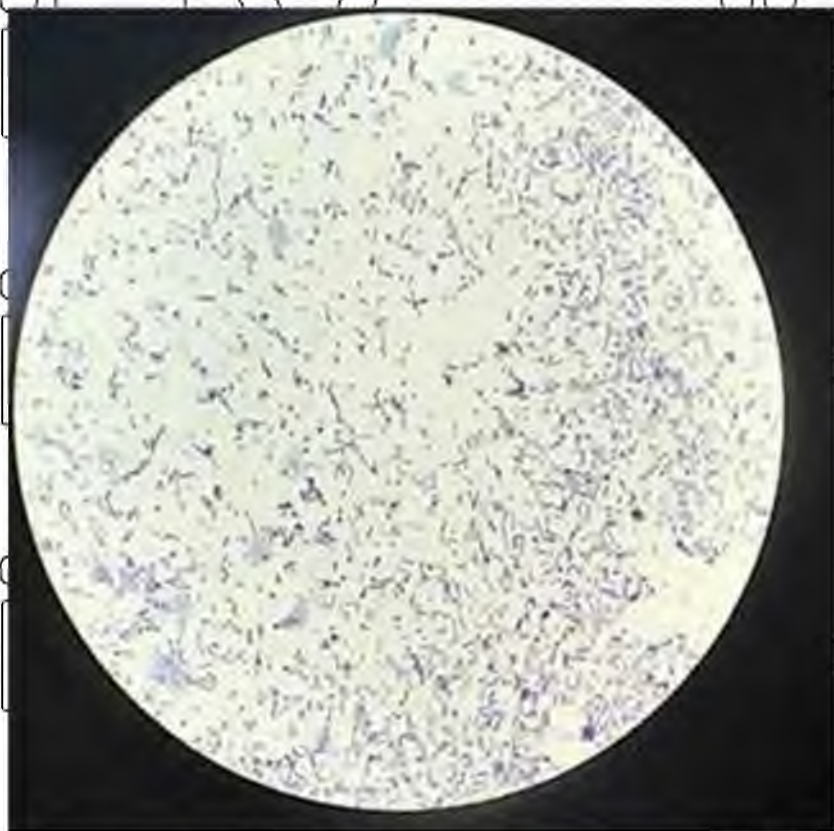


Рис. 3-5. Отримані у досліді бактерії роду *Listeria* 40x

Ми вирощували штами лістерій на мартенівському агарі за температури 37 °С протягом 24-48 год до отримання активної фази росту. Мікроорганізми і їх культури, котрі вирости, змивали стерильним фізіологічним розчином, далі змивували. Центрифугування проводили протягом 20 хв при 2000 об/хв. Осад лістерій піддавали екстрагуванню спочатку спиртом, а потім сумішшю спирту.

Далі осаджували біомасу лістерій центрифугуванням при 2000 об/хв протягом 20 хв, таку обробку антигену повторювали кілька разів. В кінцевому підсумку лістерії консервували 1% борною кислотою, доводячи концентрацію мікробної суспензії до 50 млрд/мл. Готовий продукт антигену ми розливали в ампули і піддавали контролю.

Антигени з однаковими особливостями у технології виготовлення, застосовували у РА для діагностики бруцельозу, кампілобактеркозу, мікоплазмозу, сальмонельозу та інших інфекцій.

З жовтків інокульованих ембріонів, тканин заражених тварин та з культур клітин готували корпускулярні вірусні, рикетсійні антигени-діагностикуми. Такі матеріали попередньо підлягали обробці ефіром і диференціальному центрифугуванню для максимального звільнення від тканинних елементів.

Очищена суспензія рикетсій і вірусів консервувалася 0,25 – 0,5 % фенолом або 0,2% формаліном. Для зараження курячих ембріонів рикетсіями використовувалися штами рикетсій Провачека, Музера і Бурнега.

Щодо розчинних антигенів – це умовно чисті антигени (білки різного ступеня складності, полісахариди), які найчастіше готували у вигляді екстрактів з агарових культур відповідних мікроорганізмів. Вони використовувалися для постановки серологічного діагнозу із застосуванням РЗК при сальпі, бруцельозі, інфекційному епідидиміті і інших захворюваннях, також при постановці діагнозу із застосуванням реакцій імунодифузії (РІД) на бруцельоз, лейкоз.

Ми з'ясували, що для РЗК можна використовували і корпускулярні антигени. Хотіли б зазначити, що раніше існуюча думка про необхідність застосування при постановці РЗК тільки розчинних антигенів виявилася недостовірною.

За серологічної діагностики бруцельозу використовували єдиний корпускулярний антиген з слабовірудентним штамом *Bruceia abortus 19*, інактивованим нагріванням, цей антиген застосовували за серологічної

діагностики бруцельозу із застосуванням РА, РЗК і РДСК, корпускулярний антиген застосовували для РЗК і при діагностиці лістеріозу.

Щоб підвищити ефективність діагностики у системі організації протиепізоотичних заходів, необхідно розширити асортимент високоефективних діагностикумів, придатних до використання в лабораторних і польових умовах.

Для цього ми готували корпускулярні антигени, зафарбовані будь-якими барвниками. Наприклад, для постановки пластинчастої реакції аглютинації на бруцельоз ми застосовували антиген, який представляє суспензію в буферному розчині мікробних клітин *Br. abortus 19*, інактивованій нагріванням і фенолом і забарвлених бенгальської рожевої в малиново-рожевий.

Фахівцями біофармацевтичного виробництва розроблено антиген для пластинчастої реакції аглютинації, що являє суспензію у буферному розчині інактивованої автоклавуванням культури збудника сапу, вирощеної в синтетичному середовищі і пофарбованому бенгальським рожевим.

Коли ставили діагноз бруцельоз для кільцевої реакції з молоком використовували антиген у вигляді суспензії інактивованих нагріванням бруцелл, забарвлених гематоксилином у синій колір. За діагностики пуллороза – тиф птахів, і постановці кровокпельної реакції аглютинації (ККРА) на склі ми використовували кольоровий антиген, котрий являє собою гомогенну суспензію клітин *S. gallinarum*, убитих формаліном і забарвлених кристаллфіолетом.

Антиген готується з п'яти штамів зазначеного мікроорганізмів, вірулентних для птахів, зберігали в S формі. З *Mycoplasma gallisepticum* готується антиген для діагностики респіраторного мікоплазмозу птахів, це суспензія мікробних клітин, знешкоджених фенолом і забарвлених 0,5% генціанфіолетом. За деяких інфекцій рекомендувалися і промисловим способом виробляються еритроцитарні діагностикуми.

Такі антигени це 5-10% суспензія еритроцитів (вівці), сенсibiliзованих полісахаридно-поліпептидною фракцією відповідних збудників хвороби. Вони

призначені для прижиттєвої діагностики зазначених і деяких вірусних інфекцій у застосуванні реакції непрямой гемаглютинації (РНГА).

Для одержання полісахаридно-поліпептидної фракції проводився гідроліз

бактерійної маси сальмонел оцтовою кислотою і осадженням її етиловим

спиртом. Кров для одержання еритроцитів стерильно брали з вен тварини у

посудину із стерильним розчином («Опсевере»). Еритроцити кілька разів

відмивали фосфатним буфером, центрифугували, консервували формаліном і

ресуспендували у фосфатно-буферному розчині. Після чого їх сенсibiliзували

полісахаридно-поліпептидною фракцією сальмонел. Сенсibiliзовані

еритроцити розводили фосфатним буфером з формальдегідом до 10,

розфасовували і здавали на контроль. Еритроцитарний антиген контролюється

на специфічність, активність, стерильність, рН і концентрацію еритроцитів.

Нами частково удосконалено апаратурно-технологічну схему виробництва

еритроцитарного діагностикуму із *S. Gallinarum* (рис. 3.6).

За виробництва антигенів-діагностикумів окрім культивування потрібних мікроорганізмів поверхневим способом, вже пропонувалися технології

виробництва антигенів з виробничих штамів, отриманих за глибинного

культивування. У 1996 р. на одному з біотехнологічних виробництв апробували

технологію розробки єдиного бруцельозного антигену для серологічної

діагностики бруцельозу сільськогосподарських тварин в РА, РЗК і РДСК шляхом

культивування слабовірулентним штамом *Br. abortus 19*.

Порівняльний аналіз антигенів, котрі вирошені з культур бруцел на щільних і рідких поживних середовищах, не виявив суттєвої різниці у їх

активності. Крім того, він виявився специфічним, не володів гемотоксичністю і

був анти комплементарний.

Після концентрування лістерій методом центрифугування та на установці

порожнистих волокон (УПВ-6) бакмасу всіх штамів у рівних співвідношеннях

з'єднували, далі суміш обробляли етиловим спиртом та сірчаним ефіром згідно

інструкції з виготовлення лістеріозного антигену, саму концентрацію антигену доводили до 50 млрд / см³.



Рис. 3.6. Апаратно-технологічна схема біовиробництва еритроцитарного діагностикуму із *S. Gallinarum*

При перевірці їх активності і специфічності відміностей від антигену, одержаного з лістерій, вирощених на щільних середовищах не виявлено.

Використання даної технології одержання лістеріозного антигену УНШЕВ для РЗК дозволяє одержати за короткий час отримати велику кількість бактеріальної маси, що значно зменшує затрати праці, матеріали і енергоресурси.

Діагностичні антигени ми перевіряли на активність, специфічність та стерильність. Стерильність антигенів, як і інших біопрепаратів, встановлювали висівами їх на живильні середовища з метою виключення контамінації бактеріальною та мікологічною мікрофлорою – МПБ з глюкозою, МППБ з вазеліновим маслом, МПА, агари Сабуро і Чапека.

У відповідних серологічних реакціях (РЗК, РП, РА та інших) встановлювали специфічність і активність антигенів зі специфічними стандартними сироватками, котрі містять строго певну кількість міжнародних одиниць (МО) антитіл. Одночасно їх перевіряли з негативними сироватками і фізіологічним розчином, за якими реакції повинні бути негативними. За стандартними негативними сироватками визначали робочу концентрацію відповідного антигену, далі його розфасовували по флаконах і після відповідного контролю відправляли у відділ діагностики.

3.3. Розробка та контроль стерильності моноклональних антитіл

Відомо, що антитіла строго специфічні і здатні виявити мінімальні відмінності в хімічному складі і просторової конфігурації молекул. У результаті складної антигенної структури багатьох мікроорганізмів за імунної відповіді на них в організмі утворюються високогетерогенні (неоднорідні) антитіла, тобто в сироватці з'являється суміш антитіл. Останні продукувалися різними лініями В-лімфоцитів і спрямовані до різних детермінант антигену. Якщо певну лінію лімфоцитів вдалося виділити і культивувати поза організмом, як культури клітин, то отриманий клон лімфоцитів продукував би однорідний тип антитіл – моноклональні антитіла. В імунології така ідея існує давно. Антитілоутворючі лімфоцити погано ростуть в культурі і нерідко відмирають. У той же час клітини злужкісній пухлини кісткового мозку, міеломи, маючи здатність до необмеженого росту, інтенсивно продукували імуноглобуліни, ідентичні між

собою за структурою, по суті це моноклональні антитіла до невідомого нам антигену.

На підставі гібридомної технології у нас є можливість отримати такі клони гібридних клітин, які б поєднували енергію розмноження мієломних клітин з високою продукцією антитіл лімфоцитів, щоб вони постійно продукували моноклональні антитіла.

Вченими отримано результати злиття – це клітини мієломи Р3 і лімфоцитів з селезінкою мишей, імунізованих еритроцитами в присутності поліетиленгліколю, гібридні клітини, які при культивуванні в селективній середовищі продукували імуноглобуліни тільки до еритроцитів. Такі клітини-химери або гібридоми, котрі одержали шляхом злиття антитілоутворюючих лімфоцитів і пухлинних клітин, успадковували здатність до необмеженого росту в культурі *in vitro* і в той же час до продукції антитіл певної специфічності (моноклональних антитіл).

Також слід мати на увазі, що після злиття клітин двох близьких ліній утворюється клон антитіла, які він утворює і необов'язково вони є моноклональними в імунологічному сенсі, так як в кожній клітині гібридного клону спочатку присутні хромосоми обох батьківських клітин. Експресія цих хромосом веде до продукції як селезінкових, так і мієломних імуноглобулінів. Однак на ранніх стадіях розмноження гібридних клітин швидко втрачається частина хромосом. Важливим при цьому є виділити клони клітин, які втратили хромосоми, що властиві мієломи, але зберегли хромосоми імунних лімфоцитів, тобто виділяють ті клони клітин, які синтезували тільки важкі і легкі ланцюги імуноглобулінів до заданого антигену.

Наприклад, співробітниками «Біофарма» отримані моноклональні антитіла, специфічно взаємодіяні з поверхневими антигенами мікобактерій туберкульозу. Була розроблена імуноферментна тест-система для проведення ідентифікації мікобактерій туберкульозу бичачого виду і диференціація їх від мікобактерій людського виду і атипичних, повільно зростаючих мікобактерій.

Отримані дані засвідчують високу специфічність моноклональних антитіл і кореляцію результатів, що отримані методами ІФА і загальноприйнятими методами. У той же час імуноферментний аналіз вимагає для виявлення антигену

невелику кількість мікробної маси. Найголовніше, що процес нетривалий і це дозволяє оперативно вживати заходів з оздоровлення виявлених специфічних щодо туберкульозу пунктів.

Досить перспективним у діагностиці вірусних хвороб є отримання моноклональних антитіл на основі гібридомної технології. Цінність цього методу – гібридомна лінія клітин можна зберігатися у замороженому стані, тому для наукових і практичних цілей створюються гібридомні банки.

Крім діагностичних цілей, моноклональні антитіла використовуються для визначення доз лікарських препаратів, алергенів у харчових продуктах та виявлення злоякісних пухлин. За допомогою моноклональних антитіл можливо

також виділення біологічно активних речовин зі складних сумішей: білків, гормонів, токсинів.

Метою досліджу було дослідити різноманітні технології отримання терапевтичних моноклональних антитіл та процес їх виробництва.

Мишачі антитіла

Класична технологія гібридомна полягає в наступному: антиген вводять мишам, і за рахунок природньої імунної відповіді антитіла виробляються за потрібної специфічності. Клітини селезінки з В-лімфоцитами, котрі продукують антитіла, виділяють і зливають в *in vitro* з клітинами мієломи. Злиті гібридомні

клітини відбираються спеціальними середовищами відбору, які вбивають незлиті клітини. Для виробництва антитіл та необмеженого росту гібридомні клітини містять інформацію від обох батьківських клітин. Ідентифікуються

клітини гібридами з ретельним скринінговим процесом, завдяки цьому і продукують бажані моноклональні антитіла, які можна культивувати масово, як для отримання великої кількості антитіл, оскільки зберігати замороженими в рідкому азоті є недоцільно. Недоліки цього процесу: неможливість

контролювати афінність та селективність антитіла; мишачі антитіла є чужорідними людині оскільки мають різні амінокислотних залишки.

Ось чому найперше комерційне антитіло «Muromonab-CD3» викликало антитільну відповідь у багатьох пацієнтів, яке має назву «НАМА» – human anti-mouse antibodies, що означає «людські антимишачі антитіла». Антитільна відповідь послаблює ефективність препарату, оскільки призводить до його виведення з організму. А повторне введення робить недоцільним, що може спричинити сильнішу імунну реакцію.

Химерні антитіла

Першим типом антитіл, наближеним до людських, стали химерні антитіла; стали моноклональні антитіла отримані від нелюдського виду (наприклад, миші, щурів), «олюднені» у різному ступені за допомогою інженерних амінокислотних замінів, які роблять їх більш схожими на послідовності отримані від людського організму. Їх отримано допомогою технологій рекомбінантної ДНК.

Ритуксимаб – відоме антитіло призначене для лікування В- клітинних лімфом, проти білка CD20 на поверхні В- лімфоцитів, отримане методом гібридом, де об'єднано фрагменти з людськими константними доменами. Таким чином досягли вмісту людських ділянок понад 70%. В схемах лікування лімфом включення «Ритуксимабу» зробило революцію, дозволивши не тільки збільшити час до прогресування захворювання, але і підвищити загальну виживаність .

Генна інженерія антитіл

Створення генно-інженерної конструкції для експресії антитіла стартує з вибору системи експресії, вектора та оптимізації нуклеотидної послідовності, яке кодує антитіле. Необхідно відкоригувати склад кодонів таким чином, щоб експресія антитіла була максимальною. Амінокислотний склад білка оптимізують. Мета – зниження агрегації, ймовірності випадання в осад, імуногенності, також важливо забезпечити якісне згортання ланцюгів і їх зв'язків між собою. На сьогодні існують протоколи, що дозволяють оптимізувати

нуклеотидну послідовність генно-інженерних конструкцій для продукції антитіл *in silico* (за допомогою комп'ютера або комп'ютерної симуляції). Зрозуміло, що станне слово залишається за експериментальними дослідженнями, оскільки це лише модель.

Як відомо у якості вектора використовують плазміди, що кодують як сам ген білка, так і допоміжні елементи, для експресії в клітині використовують промотор цитомегаловірусу, високу ефективність транскрипції це забезпечує.

Двохплазмідну систему експресії використовують, оскільки антитіло складається з двох поліпептидних ланцюгів (легкий і важкий) та одного вектора, який містить обидва гени. Такий варіант є оптимальним, тому що дозволяє точно контролювати співвідношення продукції легких (LC) і важких (HC) ланцюгів. Відомо, що В-клітини легкі ланцюги синтезують у більшій кількості зокрема у природних умовах, ніж важкі, це співвідношення швидкостей синтезу допомагає продукувати антитіла.

Вектор обов'язково має мати ген стійкості до антибіотика, у його присутності вирощують потрібні клітини. За додавання антибіотика до клітин, які не мають вектора, останні загинуть, так проводиться їх відбір. Не зважаючи на те, що антитіло синтезується у клітинах всіх тварин, маніпуляції з вектором – вставка гена і клонування, проводяться у бактеріях.

На прикладі «Інфліксімабу», препарату проти некрозу пухлин (*Tumor necrosis factor*), який застосовується для лікування ревматоїдного артриту та хвороби Крона досить легко охарактеризувати технологію отримання химерних антитіл. Мишей імунізували людським TNF (hTNF) у додаванні ад'юванту – речовини, котра посилює імунну відповідь. Далі виділяли еспленоцити і зливали їх з клітинами міеломи. Радіоімунний метод з іммобілізованим hTNF використовують для відбору клонів клітин, які експресують потрібні антитіла. з використанням фагових векторів і скринінгу шляхом Саузерн-блоту «будують» геномні бібліотеки, які виділяють гени, котрі кодують легкі і важкі ланцюги антитіл. Звідти отримують плазмиду, яка містить гени мішаних варіабельних

ділянок. Після об'єднання з генами В-клітин людини і їх константних областей, які були отримані секвенуванням і вводять їх у клітини мишачих пухлин для продукування химерного антитіла [14,17,19].

Гуманізовані антитіла

Не дивлячись на те, що химерні антитіла ефективніші і менш імуногенні, ніж повністю мишачі, але останні викликають НАСА-відповідь. Так зване утворення human anti- chimeric antibody – людські антитіла проти химерних антитіл. З кінця XX століття почали розробляти гуманізовані антитіла, у яких чужій людині тільки CDR і окремі позиції FR-регіонів варіабельних доменів, а інші майже повністю людські. CDR – імуноглобуліни, якими вони зв'язуються зі своїм специфічним антигеном, як найбільш мінливі частини молекул, CDR мають особливе значення для біорізноманітності антигенної специфічності, яка генерується лімфоцитами.

Відомим антитілом є «Алемтузумаб» проти антигену лімфоцитів CD52, який застосовується у лікуванні від розсіяного склерозу, їх отримано на основі шурячого антитіла, CDR котрого перенесли у людські домени вже існуючого людського антитіла VH і VL.

При розробці антитіла «Даклізумаб» проти рецептора CD25 на T-лімфоцитах застосували інший підхід, він став першим гуманізованим антитілом на ринку. Препарат отриманий включенням в людський каркас мишачих CDR, людські ділянки антитіла були підбрані в цьому випадку комп'ютерними методами так, щоб максимізувати схожість з мишачим антитілом, звідки отримано CDR. Поліпшити афінність дозволило побудова моделі мишачого антитіла і амінокислотні залишки каркаса, які контактували з CDR, були перенесені у каркас людського антитіла.

Не дивлячись на те, що гуманізовані антитіла мають високу кількість людських послідовностей порівняно з химерними, ймовірність продування

антитіл проти них лишається. Вони мають назву НАНА (human anti-human antibody, людські анти-людські антитіла).

Як висновок НАМА-відповідь може бути направлена на все антитіло, НАСА – проти варіабельних областей, а НАНА-відповідь більш фокусний тільки проти CDR.

Слід зазначити, що не всі амінокислотні залишки і їх групи подібні за своєю імуногенністю, все більш складно уточнити, що являє собою химерне антитіло, що являє собою гуманізоване антитіло (наприклад, скільки амінокислотних залишків потрібно змінити, щоб антитіло могло називатися гуманізованим). Як наслідок межа між химерними, гуманізованими і людськими антитілами у багатьох випадках розмита, у зв'язку з цим в 2017 р. ВООЗ вирішила скасувати існуючу раніше номенклатуру, згідно якої мишачі антитіла мали суфікс – mоtab, химерні – хіtab, гуманізовані – zumab, а повністю людські – humab.

Повністю людські антитіла

Як було зазначено на початку підрозділу 3.3, повністю людські моноклональні антитіла займають більше половини ринку терапевтичних препаратів. Для їх отримання використовують 3 основні методи, розроблених методом одиничних В-клітин. На сьогодні не затверджено жодного терапевтичного препарату, але дослідити технологію фагового дисплею та метод трансгенних мишей наша одна з задач.

Технології фагового дисплея

Фаговий дисплей є найпоширенішим методом у якому використовують як вихідний матеріал широкий репертуар генів, що кодуєть антитіла. Він був винайдений наприкінці 90-х ХХ ст. у якості представлення пептиду на поверхні М13 бактеріофага.

Першим антитілом, створеним за допомогою технології фагового дисплея у 2002 році стали ліки «Хуміра» («Abbott») проти мішені TNF для лікування ревматоїдного артриту і хвороби Крона.

Якість отриманої бібліотеки фрагментів залежить від якісних антитіл та їх компетенції мати широкий спектр різноманітності антитіл. Є два шляхи до отримання бібліотек: природний і синтетичний. Натуральні бібліотеки антитіл

варіабельних доменів отримують з лімфоїдних тканин або периферичної крові

людей, а також інших тварин шляхом полімеразної ланцюгової реакції

природних генів зі зворотною транскрипцією. Так як їх гени кодують

функціональні антитіла перевага цього методу в тому, що отримані антитіла

будуть в правильній конформації. А недоліком є те, що різноманітність

последовностей обмежена лише включенням природної імунної системи, де

присутня певна нерівномірність використання протилежних последовностей.

Частини природних бібліотек непередбачувані за складом і відрізняються за

якістю; деякі можуть виявитися недостатньо стабільними або невідповідними.

Склад природних бібліотек містить 107-1011 фрагментів.

Синтетичні бібліотеки ж формуються шляхом вбудовування спеціально

синтезованої ДНК у ті последовності, котрі кодують варіабельні домени. ДНК

синтезується так, щоб була можливість вносити абсолютно випадкові мутації в

одержані фрагменти антитіл. Тим самим розширюється різноманітність ділянки,

яка визначає компліментарність до CDR; синтетичні бібліотеки дозволяють

використовувати певну структуру зародкової лінії (germline) до варіабельного

домену, яка найбільш представлена в кожному біоб'єкті, стабільна та

неімуногенна. До неправильного формування структури і агрегації білка може

привести введення повністю синтетичних ділянок CDR. Для визначення, які

CDR краще використовувати, знадобилося багато часу і напрацювань. Склад

синтетичних бібліотек містить до 109-1011 фрагментів.

Відбір клонів з потрібними властивостями проходить наступним чином:

ген фрагмента антитіла вставляється у фагову ДНК тобто в частину гена, яка

кодує білок оболонки цього фага, що призводить до експресії на поверхні фага

білка у вигляді фрагмента антитіла. Далі гени перенесли за допомогою

трансдукції в бактерійні клітини *Escherichia coli* та інкулювали ще одним

фагом, який викликає «монтаж» бактеріофага, який містить на поверхні фрагмент антитіла. Як наслідок маємо бібліотеку бактеріофагів, у кожного з яких на поверхні експресується фрагмент антитіла належний гену, котрий потрапив у даний бактеріофаг.

Фагову бібліотеку (10⁶-10¹¹ клонів), з іммобілізованим антигеном інкубували протягом кількох діб. Фаги, які не зв'язалися видаляли шляхом промивання, лишили тільки бактеріофаги, які містили вставку гена фрагмента антитіла з високою спорідненістю до антигену. Щоб відселектувати найвисокоафінніші клони, які зв'язалися з антигеном, фаги знімали з поверхні і знову інкубували ними *E. Coli*, процес повторювали 2-3 рази для збагачення специфічними до антигену популяції антитільними фрагментами. Отримані ДНК фаги секвенували і отримували послідовність, яка кодувала найбільш афінні послідовності. Клітини висівали на середовище, яке містило антибіотик, далі ампліфікували.

Можливість відбирати лише антитіла, які не зв'язуються з не потрібними білками, з близькими до мішені, але й які не потрібно блокувати, щоб не викликати токсичність є вагомою перевагою використання дисплейних методів порівняно до гібридомних; для цього достатньо іммобілізувати небажаний білок і відбирати ті фаги, які з ним не зв'язалися.

Перспективно створити антитіло, яке б пов'язувалося і з мишачим, і з мавпячим, і з людським варіантами мішені. Така можливість забезпечить швидке успішне проходження доклінічних досліджень та контроль безпеки до виведення потенційного лікарського кандидата у клінічні випробування.

На сьогодні відомо наступні типи дисплеїв: рибосомний або дріжджовий. Принцип такий самий, вони забезпечують зв'язок гена, що кодує фрагмент антитіла, з його афінністю до мішені, тобто з фенотипом. Дозволяють проводити відбір по заданих властивостях з величезної кількості варіантів в бібліотеці.

Особливості способу використання трансгенних тварин, які експресують людські варіанти антитіл.

Переваги методу трансгенних тварин перед дисплейними: пришвидшений процес утворення антитіл та так як відбір йде *in vivo*, а не *in vitro*, виключено утворення антитіл з низькою розчинністю.

За допомогою даного методу було отримано одне з найвідоміших зараз антитіл «Ніволумаб» проти мішені PD-1 на активованих T-лімфоцитах. Це антитіло викликало революцію у лікуванні метастатичних злоякісних захворювань: раку легень, меланоми, раку сечового міхура.

Препарат «Ніволумаб» був розроблений за технологією компанії «Medarex», котра у 1993 році отримала лінію мишей, що експресують людські IgM, IgG і Igk і не експресують мишачі IgM і Igk. Миші виявилися здатними до продукування повноцінних B-клітин, де відбувається V(D)J-рекомбінація людських трансгенних ділянок – механізм соматичної рекомбінації ДНК, який проходить на первинних етапах диференціювання лімфоцитів і призводить до утворення антиген-розпізнаючих ділянок антитіл і T-клітинного рецептора. Після введення антигенів, переключення класу важкого ланцюга і соматичний мутагенез. Згодом з даних мишей за гібридною технологією отримують людські антитіла.

За виробництві «Ніволумаба» трансгенних мишей, імунізували рекомбінантним людським білком PD-1-Fc, який складається з позаклітинного домену PD-1 і Fc-фрагмента IgG. Водночас мишам вводили клітини з яєчників китайського хом'ячка CHO, які експресували на поверхні PD-1. Спленоцити мишей були злиті з клітинами міеломи SP2/0 та відібрано гібридами, що виробляли антитіла за допомогою імуноферментного аналізу. Зв'язування «Ніволумаба» з CD4+ лімфоцитами визначали методом проточної цитофлуориметрії, а кінетику зв'язування з мішенню – методом плазмонного резонансу.

Обмеженого репертуару генів, які кодують людські VH і VL вистачає для генерації антитіл з високою афінністю. Зробити це не вдасться навіть якщо антиген, до якого треба отримати антитіла є високоомологічним з мишачим

аналогом. Тоді можна використати трансгенних шурів, курей або дисплейні технології. Останні є єдиним виходом, коли мішень токсична у концентраціях, які необхідні для імунізації тварин.

Виробництво антитіл. Отримання клону-продуцента

Для правильного вбудовування вектора в геном клітини і отримання стабільного клону-продуцента антитіл потрібно домогтися зміни апарату трансляції та посттрансляційних модифікацій, домогтися високої життєздатності продуцента. З цією метою знижували експресію про-апоптичних факторів і підвищували експресію анти-апоптичних у клітинах СНО (клітини яєчників китайського хом'ячка). В геном клітини-продуцента вбудовують модифікації, щоб забезпечити бажані глікозилювання, підвищену трансляцію білка, з метою забезпечення правильного згортання антитіл і захисту клітини від апоптозу під впливом стресу.

Підбір та оптимізація процесу культивування починається після створення клітинної лінії. У результаті скринінгу сотень і тисяч клонів відсеleктовують клон-продуцент з найкращими характеристиками, для культивування в реакторах об'ємом 10-25 л.

Культивування

Традиційними методами культивування є процеси batch і fed-batch. Як правило клітини, які продукують антитіла, культивують в біореакторах-ферментерах. При batch всі компоненти середовища разом з клоном-продуцентом завантажують в біореактор на кілька діб, далі збирають культуральне середовище для виділення білка. У випадку fed-batch у середовище періодично додають поживні речовини.

Найважливішим фактором забезпечення високих виходів білка є культуральне середовище. Причому прогрес в цій області триває і на сьогодні можна отримати виходів цільового білка понад 10 г/л. Це стало можливим завдяки переходу від середовищ, що містять сироватку тварин до безсироваткових середовищ. На початковому етапі використовувалися

гідролізати білків, сьогодні синтетичні середовища з чітко визначеним складом. Варіабельність компонентів погіршує параметри культивування.

Застосовують також тонке налаштування параметрів середовища зі зворотним зв'язком температури, рН, сольового складу, рівнів кисню та вуглекислого газу для підвищення продуктивності, це дозволяє знизити концентрації токсичних побічних продуктів (молочної кислоти, аміаку) і більш гнучкої витрати поживних речовин.

На сьогодні існує тенденція до переходу на безперервні процеси на так зване перфузійне культивування, за якого свіжеприготовлене середовище безперервно додається до клітинної культури, а продукт відводиться з неї. Процес доступніший і автоматизується, видає продукт вищої якості і більші його виходи. Перехід від сталевих біореакторів до одноразових показує ряд переваг: постачаються чистими і стерильними, не потрібно готувати до культивування,

висока валідація процесу виробництва, мають більшу гнучкість у разі потреби зміни параметрів процесу, не потрібно очищати в разі контамінації і готувати до експлуатацію.

Основними етапами виділення та очистки антитіл є різні види хроматографії, діалізація і інактивація вірусів.

Використання хроматографії з білком А одна з особливостей очищення антитіл в порівнянні з іншими білками, це білок клітинної стінки золотистого стафілокока, який міцно і селективно зв'язується з антитілами за середнього рН.

Це кращий метод на першому етапі очищення антитіл завдяки високим виходам і чистоті продукту.

Сталість складу продукту – найважливіша вимога на стадії виробництва і очищення антитіл. Складний об'єкт антитіла, яке проводиться у біологічній системі і молекули якого виходять не однакові, а з варіаціями. Завдання процесу виробництва і очищення досягти, щоб ці варіації не впливали на фармакологічні характеристики продукту, його стабільність, і змінювалися від однієї партії товару до іншої. З цією метою валідується процес виробництва

експериментальне підтвердження те, що процес забезпечує отримання продукту з належними характеристиками.

На фінальному етапі і деяких проміжних контролюють склад продукту аналітичними методами: білок А, наявність вірусів, бактеріальні ендотоксини,

білки і ДНК продуцента, залишки культурального середовища (антибіотики, сироватки), залишки від процесів (ферменти, реагенти, солі, розчинники тощо);

фізико-хімічні властивості (дисульфідні зв'язки, електрофоретичний, хроматографічний, спектроскопічний профілі, вуглеводний склад,

варіабельність N- і C-кінцевих залишків, наявність ізоформ, гетерогенність заряду молекули).

Як висновок можна сказати, що методи виробництва антитіл весь час удосконалюються з моменту виведення першого антитіла на ринок, до моменту,

коли антитіла навчилися гуманізувати, вдосконалили методи вивчення афінності і інших властивостей, розробили способи їх штучного отримання, досягли

потужного прогресу у виробництві та очищенні, що дозволило знизити собівартість антитіл.

Але й існує необхідність у швидшій і точнішій розробці антитіл проти заданої мішені. З цією метою є потреба збільшити операції в *in silico*. Це дасть

можливість не витрачати час і гроші на експерименти. Недостатність знань і потужностей для моделювання теж сповільнюють цей процес (наприклад, фармакокінетика та фармакодинаміка антитіл).

З розвитком гуманізованих і людських МАТ, швидкість затвердження нових продуктів та продаж швидко підвищуються. Подальше зростання продуктів

МАТ у найближчі роки стане головним фактором загального продажу біофармацевтичних продуктів і в результаті, моноклональні антитіла виявилися

основним класом терапевтичних засобів для лікування багатьох захворювань людини, в першу чергу онкологічних, імунологічних, інфекційних, нервових та

метаболічних хвороб.

Дисплеї фагів проявив себе як надійний метод генерування людських антитіл. Критично важливими для успішної ідентифікації терапевтичних МАТ є сховища генів, які кодують антитіла з невідомими властивостями високоякісної

бібліотеки фагових антитіл. Від якості цільового антигену, іммобілізації антигену та жорсткого контролю умов зв'язування та промивання залежить оптимальний вибір з бібліотек фагових дисплеїв. На сьогодні відомо і діють дев'ять повністю людських антитіл, котрі виявлені з бібліотек фагів, схвалених для терапії, сотні препаратів антитіл, отриманих з фагів, чекають виходу на ринок і знаходяться у клінічних випробуваннях.

Дослідники розробили кілька трансгенних тварин, включаючи мишей, повністю людських, та химерних мишей другого покоління з метою покращення якості препаратів антитіл. Безперервне удосконалення і розвиток трансгенних тварин дає більше шансів для розробки ліків антитіл для світових біофармацевтичних компаній. Залежно від протоколу імунізації, за технологією гібридоми високоафінні антитіла людини можна отримати відбір клонів, що генеруються у тварин. На даний час існує 19 МАТ людини, які були вилучені у трансгенних тварин.

Повністю людські моноклональні антитіла складають вже більше половини ринку терапевтичних препаратів. Багато частина проходить наразі клінічні дослідження та очікує затвердження. Отже, майбутнє саме за цим типом МАТ, які вже не викликають значних труднощів з імуногенністю та є значно ефективнішими.

3.4. Дослідження властивостей молекулярної ідентифікації діагностичних засобів

Здобутки і перемоги сучасної медицини, агросфери залежать від того, чи вдасться виявляти специфічні віруси, бактерії, гриби, паразитичні

НУВБІП УКРАЇНИ

мікроорганізми, білки і низькомолекулярні сполуки в організмі людини або тварин, в рослинах, воді або ґрунті. Профілактику і лікування будь-якого інфекційного захворювання вагомо спрощує попередня і точна ідентифікація патогенного мікроорганізму. Для проведення багатьох діагностичних процедур

необхідно спочатку виростити культуру потенційно патогенного мікроорганізму. Лише потім проаналізувати спектр його фізіологічних властивостей. Хоча подібні тести мали досить високу специфічність і досить ефективні, вони часто займають багато часу і є дорогими. Це стосується ідентифікації і корисних бактерій, і паразитичних мікроорганізмів. Досить

обмежена можливість виявлення патогенних мікроорганізмів, котрі слабо ростуть у культурі або взагалі не піддаються культивуванню. Облігатні внутрішньоклітинні паразитів *Chlamydia trachomatis*, які викликають хламідіоз, важко діагностувати, оскільки для цього необхідна культура клітин

безперервного типу. Відтак часто отримували помилково негативні результати, діагностували відсутність мікроорганізму і результати чого не проводяться лікування. Рутинною може стати і ідентифікація, якщо для виявлення мікроорганізму необхідно вирощувати його в культурі. Це принципове

обмеження можливо усунути розробкою методів молекулярної діагностики, в основі якого лежать імунологічні підходи або методи виявлення специфічної ДНК.

Метод для виявлення патогенних мікроорганізмів має володіти високою специфічністю і чутливістю та бути досить простим. Специфічний тест діагностичний повинен давати позитивну відповідь лише на мікроорганізм або молекулу-мішень, бути чутливим і виявляти невеликі кількості такої мішені інших мікроорганізмів або молекул, котрі забруднюють зразок. Проте методу передбачає продуктивність, ефективність і невисоку вартість для рутинного застосування.

За оцінками фахівців, обсяг світового ринку імунодіагностичних тестів до 2022 р. складе 2 млрд. дол.

Методи імунодіагностики

Імунологічні системи детекції мають високу чутливість і специфічність, вони широко використовувалися для тестування лікарських препаратів, визначення специфічних метаболітів, оцінки, моніторингу різних онкологічних захворювань, ідентифікації і контролю патогенних мікроорганізмів. Якщо молекулою-мішенню є білок, то необхідно забезпечити експресію детермінувати його генів і створити умови, в яких не відбувається блокування або маскування сайту зв'язування з антитілом. Процедури традиційної діагностики збудників інфекції спиралися або на одну унікальну, легко помітну його особливість, або на набір характеристик патогенного мікроорганізму. Клінічні мікробіологи знайшли мінімальний набір біологічних значень, за допомогою яких можна гарантовано виявляти і ідентифікувати патогенні мікроорганізми. Деякі збудники виробляють специфічні біохімічні сполуки, які необхідно виявити в

біологічному зразку. Таку маркерну молекулу виявляють, коли проводять високоспецифічний біохімічний аналіз. Такий спосіб призведе до збільшення числа індивідуалізованих систем детекції патогенних мікроорганізмів.

Найкращим був би універсальний метод, котрий дозволяє виявляти будь-яку маркерну молекулу незалежно від її хімічної природи, саме таким є метод, заснований на ідентифікації комплексів антиген-антитіло.

Відомо ряд підходів, котрі дозволяють визначити чи відбулося зв'язування антитіла з антигеном-мішенню, один з таких методів ферментний імуносорбентний аналіз. Ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA) часто використовували для діагностики. Процедура включає наступні етапи: зразок, в якому треба виявити специфічну молекулу або мікроорганізм, фіксували на твердій основі, наприклад на пластикових мікротитрувальних планки, зазвичай має 96 лунок; до фіксованого зразку додали антитіло, специфічне до маркерної молекули (перше антитіло), потім промивали лунку, щоб видалити незв'язану молекули першого антитіла; далі додається друге антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антитілом і не взаємодіє з маркерною молекулою. З цієї

метою антитілу приєднали фермент (наприклад, лужна фосфатаза, пероксидаза або уреаза), котрий каталізує перетворення незафарбований субстрат в забарвлений продукт. Далі лунку промивали, щоб вилучити незв'язану молекулу кон'югата іншого антитіла-фермент.

Якщо первинне антитіло не зв'язується з мішенню зразка, то його видаляємо за першого промивання. Оскільки кон'югат іншого антитіла ні з чим зв'язується, він видаляється за другого промивання, зразок залишається незабарвленим. Якщо зв'язування з мішенню відбувається, то друге антитіло приєднується до першого, а кон'югований фермент підсилює утворення легко реєстрованого пофарбованого продукту.

Основна дія ELISA – специфічне зв'язування первинного антитіла з мішенню. Якщо молекула-мішень є білком, то його очищений препарат використовували для отримання антитіл, за допомогою яких потім і виявляють це. Антитіла (антисироватки), котрі утворюються в сироватці крові імунізованих тварини (зазвичай мишей), зв'язувалися з різними антигенними детермінантами (епітопами) молекули-мішені. Цю суміш антитіл називали поліклональним препаратом. Використання поліклональних антитіл має два недоліки, істотних для деяких методів діагностики: вміст окремих антитіл в поліклональних препаратах може варіювати від однієї партії до іншої; поліклональні антитіла не можна використовувати, якщо необхідно розрізнити дві подібні мішені, тобто коли патогенна (мішень) і непатогенна (НЕ-мішень) форми розрізняються детермінантою. Ці проблеми пілком вирішуються, оскільки зараз навчилися отримувати препарати антитіл, котрі продукуються до однієї антигенної детермінанти, тобто препарати моноклональних антитіл.

3.5. Розробка біотехнологічних аспектів створення специфічних імунобіологічних препаратів направленої дії

Приготування вірусних діагностикумів (сироваток та антигенів) має свої особливості. Діагностичні антигени готували використовуючи органи інокульованих тварин. У такому випадку мова йде про органи антигенів. Якщо

такі антигени готували із застосуванням культур клітин, то одержували,

культуральні антигени. Головним їх недоліком є вміст у складі баластних білків,

в тому числі білків інших вірусів, які можуть бути у вихідній сировині, це впливає на активність та специфічність антигенів. Вважають, що в такому

випадку дослідження з конструювання синтетичних антигенів є дуже

багатообіцяючими, а перевага їх в тому, що вони мають легку стандартизацію,

високу стабільність і специфічність.

Залежно від мети використання вірусні діагностикуми поділяють:

антигени для реакції гальмування гемаглютинації та на антигени для реакції

зв'язування комплементу.

Для виготовлення діагностикумів з різних вірусів використовували

переважно такі інфіковані матеріали: для епідемічного паротиту – амніотична або алантоїсна рідина, для вірусів енцефалітів – мозкова тканина мишей, курячих

ембріонів або культура тканин, для віруса грипу – алантоїсна рідина, для

орнітозів та лімфогранульоми – жовткові мішки курячих ембріонів, для

аденовірусів і поліомієліту – культуральні рідини. Діагностикуми із амніотичної

та алантоїсної рідини використовують в нативному вигляді, інші – вимагають

спеціальної складної обробки, так як володіють антикомплементами

властивостями.

Спосіб обробки антигенів діляться на фізичні та фізико-хімічні, з фізичних

методів найбільш часто застосовували термолізис – це метод повторного заморожування та відтавання, а з фізико-хімічних методів – обробка ефіром та

хлороформом.

Особливості способу термолізісу: 10% суспензія на фізіологічному розчині

з інфікованої тканини, до неї додано 2% інактивованої сироватки морської свинки; після 18-20 год екстрагування за 4 °С тканинні частинки видаляли

шляхом центрифугування протягом тридцяти хв за 2500 об/хв; надсадову рідину піддавали п'ятикратному заморожуванню (за -7°C) та відтаванню (за $+7^{\circ}\text{C}$); потім рідину центрифугували протягом 1 год за 3500 об/хв; отриманий таким чином діагностикум був з опалесцентною рідиною.

Обробка вірусних діагностикумів фізико-хімічним методом: готували суспензію, як описано вище для термолізеу, далі додавали полутонний об'єм ефіру або хлороформу і протягом 2 год здійснювали струшування; матеріал поміщали на 18 год у холодильник при 4°C ; потім центрифугували 30 хв за 3000 об/хв; відбувалося розшарування суспензії; у випадку обробки хлороформом антиген був у верхньому шарі, а при обробці ефіром – в нижньому; готовий антиген за зовнішнім виглядом має нагадувати прозору рідину.

Вірусні діагностикуми не повинні містити живих вірусів, інактивування їх здійснювали або дією хімічних речовин (формалін), або прогріванням (37°C).

Існує значна кількість модифікацій приготування антигенів стосовно того чи іншого вірусу.

Випуск вірусних антигенів для діагностики здійснюється з наступних захворювань: орнітозів, лімфоцитарного хориоменінгіту, венесуельського енцефаломієліту, грипу та епідемічного паротиту, західного енцефаломієліту коней, аденовірусних інфекцій, японського та кліщового енцефаліту тощо.

Для визначення виду та типу виділеного вірусу широкого поширення набули діагностичні антивірусні сироватки. Виготовлення діагностичних антивірусних сироваток не відрізняється від виготовлення антибактеріальних.

В залежності від виду вірусу антивірусні сироватки одержували від різних тварин. Сироватку проти вірусу аденовірусів та віспи одержували імунізацією відповідними вірусами кроликів; проти вірусу грипу – білих щурів, мишей, хорів, вурей, проти вірусу кору – морських свинок тощо.

Необхідність суворого вибору тварини для отримання антивірусних сироваток пов'язана з урахуванням умісту в них неспецифічних інгібіторів, які пригнічують активність вірусів і неспецифічних аглютининів.

То ж перед проведенням реакції обов'язково звільняють імунні сироватки від термостабільних (обробкою вуглекислотою, ферментуванням та іншими методами в залежності від виду вірусу) та термолабільних (прогріванням за 56°C протягом 30 хв) інгібіторів та перевіряють на присутність неспецифічних аглютининів.

Тварин імунізували інактивованим або живим вірусом, після декількох імунізацій у тварин беруть кров та визначають кількість антитіл у сироватці. Сила діагностичної антивірусної сироватки визначається її титром, тобто найбільшим розведенням, що дає відповідну реакцію імунітету. Титри антивірусних сироваток визначали за допомогою різних реакцій. В залежності від того, проти якої прояви дії того чи іншого вірусу направлено антитіло. Якщо вірус володіє гемаглютинуючими властивостями, використовували реакцію гальмування гемаглютинації, котра дозволяє визначити антигемаглютинуючі властивості імунних сироваток. І якщо введення вірусу призводить тварин до їх гибелі, випробовувалась здатність сироватки попереджати смертельний результат хвороби; якщо вірус викликає дегенерацію клітин в культурі тканини, визначалась здатність сироватки нейтралізувати цю дію. У всіх випадках число вірусу, яке вводиться в той чи інший дослід з сироваткою, повинно бути ретельно відтитровано. Кількість антитіл в сироватках встановлювали шляхом визначення максимального розведення їх, за якого вони нейтралізують дію певного вірусу. Всі інгредієнти, які використовують у дослідках про визначення титру антитіл, повинні зберігатися в таких умовах, при яких вони протягом тривалого часу не втрачають своїх властивостей. Найбільше відповідає цій вимозі зберігання у висушеному стані при низькій температурі. Визначення титру є відповідальним моментом процесу виготовлення сироваток, це вимагає високих навичок та ретельності в роботі.

Дотримуючись загальних принципів одержання діагностичних сироваток, за виробництва противірусних сироваток потрібно враховувати:

1. Що антиген для імунізації має бути гранично чистим;
2. схема імунізації має бути якомога простіше і легко відтворююча
3. При виборі донорів необхідно використовувати ті види тварин, на клітинах яких готувався антиген.

Діагностичні антивірусні сироватки використовуються у постановці реакції зв'язування комплементу, преципітації, реакції гальмування гемаглютинації та нейтралізації вірусу. Найбільшого поширення набули реакції зв'язування комплементу, нейтралізації та гальмування гемаглютинації.

За допомогою гібридомної технології одержання моноклональних антитіл наразі вирішується завдання одержання специфічних антитіл.

3.6. Дослідження системи ДНК-діагностики шляхом гібридизації нуклеїнових кислот

Інформація про все різноманіття властивостей організму міститься у його генетичному матеріалі. Так, патогенність бактерій визначається наявністю у них специфічного гена або набору генів. Спадкове генетичне захворювання виникає у результаті пошкодження певного гена. Сегмент ДНК, що детермінували дана біологічна ознака, має строго певну нуклеотидну послідовність і може служити діагностичним маркером.

В основі багатьох швидких і надійних діагностичних методів лежить гібридизація нуклеїнових кислот. Тобто об'єднання двох комплементарних сегментів різних молекул ДНК, яка у загальних рисах полягає в наступному:

фіксація одноланцюгової ДНК-мішені на мембранному фільтрі; нанесення міченої одноланцюгової ДНК зонда, який за певних умов (температурі і іонній силі) з'єднується з ДНК-мішенню, промивання фільтра для видалення надлишку

незв'язаним міченим ДНК-зондом; детекція гібридних молекул зонда / мішені. В діагностичних тестах, заснованих на гібридизації нуклеїнових кислот, ключовими є три компоненти: ДНК-зонд, ДНК-мішень і метод детекції гібридизаційного сигналу.

Гібридизаційні зонди

Забезпечити адекватність діагностичного тесту, гібридизаційні ДНК і РНК зонди повинні бути високоспецифічними. Інакше кажучи необхідно, щоб зонд гібридизувався тільки з шуканою нуклеотидною послідовністю. Доцільність застосування тесту значно знижується, якщо є ймовірність отримання неправдиво позитивного (наявність гібридизаційного сигналу під час відсутності послідовності-мішені або помилково негативні (відсутність сигналу при наявності послідовності-мішені) результату. Специфічність зондів може проявлятися на різних рівнях: вони можуть «розрізняти» два і більше видів, окремі штами в межах одного виду або різні гени. Залежно від ситуації зонди можуть бути представлені молекулами РНК або ДНК; можуть бути довгими (більше 100 нуклеотидів) або короткими (менше 50 нуклеотидів), являти собою продукт хімічного синтезу, клоновані інтактні гени або їх фрагменти.

Зонди отримували різними способами. Один з них полягає в наступному. ДНК патогенний мікроорганізм розщеплювали за допомогою рестрикційної ендонуклеази і клонували у плазмідному векторі. Потім проводили скринінг рекомбінантних плазмід з використанням геномної ДНК як патогенних, так і непатогенних штамів. Ті плазміди, які містять послідовності, гібридизується тільки з ДНК патогенного штаму і склали основу видоспецифічності зондів. Далі проводили ряд додаткових гібридизацій з ДНК, виділеними з різних організмів, щоб унеможливити, що потенційні зонди не дали перехресної гібридизації з ними. Для визначення чутливості методу кожен з зондів перевіряють на модельних зразках, в тому числі і на змішаних культурах.

Обов'язковим є, щоб ДНК-діагностику можна було проводити на початковому матеріалі, без додаткового його культивування або виділення

нуклеїнових кислот, особливо в тих випадках, коли тестувалися клінічні зразки. Дослідники з успіхом проводили гібридизацію з ДНК-мішенями, присутніми в тканинах без попередньої їх очистки, в зразках калу, сечі, крові, змивах із зіву і.

Якщо концентрація послідовності-мішені в досліджуваному зразку занадто мала, її можна ампліфікувати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Нерадіоактивні методи детекції

У більшості лабораторій для гібридизації використовували зонди, мічені будь-яким радіоактивним ізотопом, найчастіше ^{32}P . Такі зонди мали високу питому радіоактивність і забезпечували відмінне ставлення сигнал-шум. Радіоактивно мічений зонд наносили на фільтр з фіксованою на ньому ДНК-мішенню, проводили гібридизацію, відмивали нез'язані ДНК-зонд і детектували мітку за допомогою радіоавтографії.

Однак ^{32}P є короткостроково живучим ізотопом, котрий випускає високоенергетичне випромінювання; при роботі з ним необхідно використовували спеціальне обладнання і забезпечувати безпечну утилізацію відходів. Щоб уникнути цих труднощів, були створені нерадіоактивні системи детекції. У цьому випадку для посилення гібридизаційного сигналу використовували ферментативне перетворення хромогенного або хемілюмінесцентного субстрату: перший з них під дією ферменту змінює забарвлення, а другий випромінює світло. У більшості подібних систем застосовувалися ДНК-зонди, які містять біотиніловані нуклеотиди. Гібридизація і детекція сигналу проводилися за стандартним протоколом.

- 1) Зонд, мічений біотин, гібридизуючою ДНК-мішенню
- 2) Промивання фільтру для видалення надлишку нез'язаного зонда.
- 3) Додавання авідину (білок курячого яйця) або стрептавідин (бактеріальний аналог авідину)
- 4) Додавання біотин ферменту – лужна фосфатаза чи пероксидазу хрому

5) Залежно від ферменту, які використовували, додали хромогенний або хемілюмінесцентний субстрат і реєстрували зміну забарвлення і люмінесценцію, які супроводжували перетворення субстрату в продукт. Нерадіоактивні системи детекції володіли і іншими перевагами: біотин ДНК залишається стабільною при кімнатній температурі як мінімум рік, методи реєстрації хемілюмінесценції володіли такою ж чутливістю, як і методи реєстрації радіоактивного сигналу; детекцію випускаючого світла проводили за допомогою рентгенівської плівки або люмінометра, як і реєстрація зміни кольору.

Біосенсорні пристрої для медичної діагностики

В даний час основними методами визначення маркерів інфекційних захворювань є імуноферментний аналіз і полімеразна ланцюгова реакція. Ці методи зарекомендували себе як високоспецифічні. Є і недоліки – тривалість постановки, відсутність жорсткого контролю якості тест-систем, можливість забруднення досліджуваних зразків ДНК, висока вартість реактивів і приладів, але методи, засновані на використанні нанобіотехнологій, дозволяють подолати ці недоліки.

Серед нанотехнологічних пристроїв найбільший інтерес являють системи на основі швидкодіючих оптичних біосенсорів, котрі дозволяють виявляти білкові маркери захворювань у реальному часі.

Сучасні оптичні біосенсори характеризувалися швидкістю аналізу – від кількох хвилин, можливістю визначати константи рівноваги і кінетичні константи формування і розпаду комплексів, час життя комплексу, мали високу чутливість і легко роботизувалися. Зазвичай сенсор складається з наступних складових.

розпізнає елемент (він також може бути названий рецепторним шаром) являє собою речовину, яка здатна селективно взаємодіяти з аналітом;

- трансдюсер, перетворює хімічну або біологічну взаємодію в електричний сигнал;

- система збору та обробки даних служить для посилення і аналізу сигналу і відображення результатів.
 НУБІП України

Необхідно відзначити, що розробка сенсорів є міждисциплінарним завданням, яке вимагає участі широкого кола фахівців: біологів, лікарів, фізиків,

інженерів, хіміків, екологів. Крім очевидних вимог, які пред'являються до нових сенсорів, таких як простота експлуатації, дешевизна, висока точність, селективність і швидкість аналізу, додалися ще вимоги мініатюризації (це пов'язано з розвитком нанотехнологій), іноді можливість працювати в

безперервному режимі, а іноді навіть – можливість впровадження в людський

організм.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

Науково обґрунтовано біотехнологічний процес виробництва і контролю діагностичних препаратів. Перспективність тематики наукового дослідження та новизну запропонованих рішень.

1. Здійснили вивчення властивостей діагностичних препаратів
2. Дослідили і опрацювали методи діагностикумів.
3. Проаналізували процес отримання діагностикуму з мікробів родини кишкових – для серологічної діагностики дизентерії і сальмонельозів.
4. Здійснили перевірку виробництва діагностичної аглютинуючої сухої сироватки – для ідентифікації сальмонел і шигел.
5. Провели контроль біотехнологічного процесу отримання діагностикуму лептоспірозного еритроцитарного полівалентного рідкого для виявлення специфічних антитіл в сироватці хворих на лептоспіроз.
6. Відстежили стерильність діагностикумів шляхом хімічного, біологічного контролю, молекулярно-біологічних методів, аналітично, технологічно.

Як узагальнення значимо, що є необхідність у швидшій і точнішій розробці антитіл проти заданих мішеней у виробництві антитіл. З цією метою є потреба збільшити операції в *in silico*. Це дасть можливість не витратити час і гроші на експерименти. Водночас недостатність знань і потужностей для моделювання сповільнюють цей процес (фармакокінетика та фармакодинаміка антитіл).

З розвитком гуманізованих і людських антитіл, швидкість реєстрації нових продуктів та продаж швидко підвищиться. Подальше зростання продуктів МАТ у найближчі роки стане головним фактором загального продажу біофармацевтичних продуктів і в результаті, моноклональні антитіла будуть основним класом терапевтичних засобів для лікування багатьох захворювань людини, в першу чергу онкологічних, імунологічних, інфекційних, первозних та метаболічних хвороб.

НУБІП України
 Дисплей фагів проявив себе як надійний метод генерування людських антитіл. Критично важливими для успішної ідентифікації терапевтичних МАТ є сховища генів, які кодують антитіла з невідомими властивостями високоякісної

бібліотеки фагових антитіл. Сотні препаратів антитіл, отриманих з фагів, чекають виходу на ринок і знаходяться у клінічних випробуваннях.

НУБІП України
 Дослідники розробили кілька трансгенних тварин, включаючи мишей, повністю людських, та химерних мишей другого покоління з метою покращення

якості препаратів антитіл. Безперервне удосконалення і розвиток трансгенних тварин дає більше шансів для розробки ліків антитіл для світових біофармацевтичних компаній.

НУБІП України
 Отже, майбутнє саме за цим типом МАТ, які вже не викликають значних труднощів з імуногенністю та є значно ефективнішими.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біотехнологія / Под ред. Н.Е.Егорова і Самуїлова - М., Виш.шк., 1987. - с. 543
2. Віестур У.Е., Шмітс І.А., Жілевіч А.В. Біотехнологія: Біологічні агенти, технологія, апаратура. - Рига, Зинатне, 1987 - с. 169.
3. Борисов Л.Б. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія. - МІА, 2005. - с. 154-156.
4. Імунобіологічні препарати для профілактики, лікування та діагностики інфекційних захворювань: навчальний посібник / За ред. Є.П. Красноженова, Т.Л. Мірютової, Томськ: Вид-во «Друкована мануфактура», 2007. - с. 175-192.
5. Медична вірусологія / За редакцією Д.К. Львова. М. .: Медичне інформаційне агентство, 2008.-с. 24-38.
6. Медична мікробіологія, вірусологія. Підручник / За ред. А. А. Воробйова, - М., 2004. - с. 158.
7. Медична і санітарна мікробіологія - Воробйов А.А. - Навчальний посібник, Виш.шк., 2003. - с. 543.
8. Промислова мікробіологія: Навчальний посібник / За ред. Н.С. Єгорова, - М. .: Вища школа, 1989. - с. 192.
9. Петров В. Імунологія - СПБ: "Лань" - 1999. - с. 57-65.
10. Поздеев О.К. Медична мікробіологія. Підручник для вузів / Під ред. В.І. Покровського. - М., 2001.-с. 233.
11. Покровський В.В. Віч інфекція. (Керівництво по епідеміології інфекційних хвороб. Т.2) М., 1993. -з. 278.
12. Керівництво до практичних занять з медичної мікробіології / Под ред. проф. Є.П. Красноженова.-Томськ: Вид-во Том. ун-ту, 2003.-260с.
13. Керівництво до лабораторних занять з мікробіології з основами асептики і біотехнології / Навчальний посібник / За ред. Н.А.Заїкиной, 2002. - с. 43.
14. Спірін А.С. Молекулярна біологія. Структура рибосом і біосинтез белка.М.Наука.1986. - с. 245.

15. Теоретичні основи біотехнології. Методичні вказівки до лабораторних занять. - Ленінград, 1989. - с. 92

16. Тутов І. К., Сітько В. І. Основи біотехнології ветеринарних препаратів // Навчальний посібник для вузів. Ставрополь 1997. - с. 159-179.

17. Улавін В.П. і ін. Завдання нанотехнології - біосенсори // В.П. Улавін, А.В. Степанов, П.Д. Дібілін, Ю.А. Соколінський // Російські нанотехнології, 2010. - №3. - С. 2-15.

18. Хімічна енциклопедія / За ред. Кнунянц. - М.: Радянська енциклопедія, 1998. - Т.2. - с. 232.

19. Яцур В.П. та ін. Моноклональні антитіла / В.П. Яцур, А.В. Юрін, П.Д. Самойлов, Ю.А. Попова // Біотехнологія, 2006. - №4. - С.2-4.

20. www.chem.msu.su/rus/teaching/biotech/all.pdf

21. Поляновский О.Л., Носиков В.В. Рестрикционные эндонуклеазы в генетической инженерии. // ВИНТИ. Серия Биологическая химия. М., 1978, - Т.14. - 190с.

22. Таяншин В.И. Рестрицирующие эндонуклеазы. // ВИНТИ. Серия Молекулярная биология. М. - 1979, - Т. 12. - Часть 1. - с.36-98.

23. Янулайтис А.А. Ферменты рестрикции и их применение. // ВИНТИ. Серия Биотехнология. М. - 1989. - Т.17. - 204с.

24. Fuchs R., Blakesly R. Guide to the use of type II restriction endonucleases. // In: Methods in Enzymology. - 1983. - V.100. - p.3-38.

25. Janulaitis A., Kazlauskienė R., Lazarevičiūtė L. et al. Taxonomic specificity of restriction-modification enzymes. // Gene. - 1988. - 74. - p.229-235.

26. Ренни В.Е., Щелкунов С.Н. Распространенность и функции рестриктаз. // Успехи современной биологии. - 1990. - Т.110. - №1(4). - с.34-47.

27. Roberts R.J., Macelis D. Endonucleases restriction. // Nucl. Acids Res. - 1996. - V.24. - N1. - p.223-235.

28. Гончар Д.А., Дедков В.С., Верховизина В.А. и др. Эндонуклеаза рестрикции Sse9 I из штамма *Sporosarcina* sp. 9D узнает последовательность ДНК 5'-AATT-3' // Мол.генет., микробиол. и вирусол.-1998.-№ 1.-с.32-34.

29. Кравец А.Н., Перцев А.В., Тарутина З.Е. и др. Новые изошизомеры рестриционных эндонуклеаз в штаммах *Pseudomonas aeruginosa* // Мол. генет., микробиол. и вирусол.-1998.-№.2.-с.14-16.

30. Королев С.В., Соколов Н.Н., Рина М. И др. Выделение и определение специфичности новых эндонуклеаз рестрикции Bsp4009 I и Asi I, изошизомеров BstH I // Мол.генет., микробиол. и вирусол.-1998.-№.2.-с.32-34.

31. Соколов Н.Н., Королев С.В., Рина М. И др. Новые сайт-специфические эндонуклеазы *Brevibacterium species* // Мол.генет., микробиол. и вирусол.-1998.-№.2.-с.35-37.

32. Luria S.E., Human M.L. A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. // *J.Bacteriol.* -1952.-V.64.-N.2.-p.557-569.

33. Крыцов В.Н., Карапетян А.Т. Выявление нового типа рестрикции и модификации в группе кишечных бактерий // *Генетика.* -1977.-13.-с.1079-1088.

34. Kruger D.H., Bickle T.A. Bacteriophage survival multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. I // *Microbiol.Rev.* -1983.-V.45.-p.345-360.

35. Андриашвили И.А., Квачадзе Л.И., Вацакидзе Р.П. и др. Молекулярный механизм защиты фаговой ДНК от рестриционных эндонуклеаз клеток *Staphylococcus aureus* // Молек.генетика, микробиол. и вирусол.-1986.-K8.-с.43.

36. Duncan C.H., Wilson G.A., Young F.E. Biochemical and genetic properties of site-specific restriction endonucleases in *Bacillus globigii* // *J.Bacteriol.* -1978.-V. 134.-N.1.-p.338-344.

37. Smith H.O., Wilcox K.W. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*! Purification and general properties. // *J.Mol.Biol.* -1970.-51.-p.379-391.

38. Meselson M., Yuan R. DNA restriction enzyme from *E.coli* // *Nature.* -1968.-217.-P.1110-1114.

39. Linn S., Arber W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. X. In vitro restriction of phage fd replicative form. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* -1968.-59.-1300-1306.

40. Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. // *Biochemistry.* - 1973. V.12. -p.3055-3063.

41. Aaij C., Borst P. The gel electrophoresis of DNA. // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1973.-269.-p. 192-198.

42. Gingeras T.R., Greenough L., Schildkraut et al. Two new restriction endonucleases from *Proteus vulgaris*. // *Nucl. Acids Res.* -1981.-9. -p.4525-4536.

43. Янулайтис А.А., Стакенас П.С., Битинайте Ю.Б. и др. Распространение специфических эндонуклеаз в различных штаммах. // Докл.АН СССР.-1983.-Т.271.-N.2.-с.483-487.

44. Соколов Н.Н., Фицнер А.Б., Хорошутина Э.Б. и др. Определение активности рестриктаз в толуольных лизатах бактериальных клеток. // *Бюл.эксперим. биологии и медицины.* -1984.-Т.2.-С.163-165.

45. Whitehead P.R., Brown N.L. A simple and rapid method for screening bacteria for type II restriction endonucleases: enzymes in *Aphanthece halophytica*. // *Arch. Microbiol.* -1985. -141. -p.70-74.

46. Sokolov N.N., Fitzner A.B., Anikeitcheva N.V. et al. A site-specific endonuclease from *Pseudomonas aeruginosa*. // *Molec. Biol. Rep.* -1985.-V.10.-p.159-161.

47. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Аникейчикова Н.В. и др. Специфическая эндонуклеаза BbvI из *Bacillus brevis*. // *Биоорг. химия.* -1992.-Т.18.-с.47-51.

48. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий. // *Прикл.биохимия и микробиология.* -1988.-Т.23.-N.1.-с. 121-124. ee

49. Дегтярев С.Х., Речкунова Н.И., Гринев А.А. и др. Выявление и определение субстратной специфичности эндонуклеаз рестрикции *Bst* 18 I и *Kzo* 9 1. // Изв. СО АН СССР. - Сер. биол. наук. - 1989. - Вып. 3. - с. 25-26.

50. Дедков В.С., Репин В.Е., Речкунова Н.И. и др. Выявление штаммов-продуцентов эндонуклеаз рестрикции среди водных микроорганизмов озера Байкал. // Изв. СО АН СССР. - Сер. биол. наук. - 1990. - Вып. 1. - с. 35-37.

51. Дедков В.С., Зернов Ю.П., Речкунова Н.И. и др. Выявление водных микроорганизмов Черного моря продуцентов эндонуклеаз рестрикции. // Молек. генетика, микробиол. и вирусол. - 1990. - Т. 12. - с. 17-18.

52. Дедков В.С., Зернов Ю.П., Совга У.У. и др. Скрининг морских штаммов-продуцентов эндонуклеаз рестрикции. // Гез. докладов. Межреспубликанское совещание "Нуклеазы микроорганизмов". - Рига. - 1989. - с. 10.

53. Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Определение эндонуклеаз рестрикции в колониях микроорганизмов *Streptomyces* и *Nocardia*. // Прикл. Биохимия и микробиол. - 1992. - Т. 28. - К. 2. - с. 309-313.

54. Репин В.Е., Дегтярев С.Х. Сравнение экспресс-методов анализа микроорганизмов на наличие активности сайт-специфических эндонуклеаз рестрикции. // Прикл. биохимия и микробиол. - 1992. - Т. 28. - N. 1. - с. 152-155.

55. Репин В.Е., Пучкова Л.И., Родичева Э.К. и др. Светящиеся бактерии продуценты специфических эндонуклеаз рестрикции. // Микробиология. - 1995. - Т. 64. - М. 6. - с. 751-755.

56. Takanami M. Restriction endonucleases AP, GA, and H-I from three haemophilus strains. // In: Methods in Mol. Biol. - 1974. - V. 7. - p. 113-133.

57. Catterall J.F., Welker N.E. Isolation and properties of a thermostable restriction endonuclease (Endo R Bst 1503). // J. Bacteriology. - 1977. - V. 129, N. 2. - p. 1110-1120.

58. Gelinas R.E., Myers P.A., Weiss G.H. et al. A specific endonuclease from *Brevibacterium albidum*. // J. Mol. Biol. - 1977. - T. 114. - p. 433-440.

59. Sato S., Shinomiya T. An isochizomer of Tag I from *Thermus thermophilus* HB 8. // *J Biochem.* -1978. -84.-p.1319-1321.

60. Baksi K., Rogerson D.L., Rushizki G.W. Rapid single-step purification of restriction endonucleases on cibacron blue F3GA-agarose. // *Biochemistry.* -1978.-V.17. -n.20.-p.4136-4139.

61. Takahashi H., Shimizu M., Saito H. et al. A new site-specific endonuclease from *Streptomyces lavendulae* (Sla I). // *Gene.* -1979. -5. - p.9-18.

62. Baksi K., Rushizky G.W. Purification of the restriction endonuclease Pal I. // *Analytical Biochemistry.* -1979. -99.-p.207-212.

63. Lin B-C., Chien M-C., Lou S-Y. A sequence-specific endonuclease (Xmn I) from *Xantomonas manihotis*. // *Nucl. Acids Res.* -1980. -V.8. -N.24.-p.6189-6198.

64. Smith H.O., Marley G.M. Purification and properties of Hind II and Hind III endonucleases from *Haemophilus influenzae* Rd. // *hr. Methods in Enzymology.* -1980.-V.65.-p.104-108.

65. Venetianer P. Purification and properties of the Bsp endonuclease. // *In: Methods in Enzymology.* -1980.-V.65.-p.109-112.

66. Bickle T.A., Pirota V., Imber R. Purification and properties of the Bgl I and II endonucleases. // *In: Methods in Enzymology.* - 1980.-V.65.-p. 132-138.

67. Wilson G.A., Young F.E. Purification and properties of the Bam H I endonuclease. // *In: Methods in Enzymology.* -1980.-V.65.-p.147-153.

68. Kleid D.G. Purification and properties of the Hph I endonuclease. // *In: Methods in Enzymology.* -1980.-V.65.-p. 163-166.

69. Rambach A. Purification and properties of the Sst I endonuclease. // *In: Methods in Enzymology.* -1980.-V.65.-p/ 170-173.

70. Lee Y.H., Blakesley R., Smith L.A. et al. Preparation and properties of immobilized sequence-specific endonucleases. // *In: Methods in Enzymology.* -1980.-V.65.-p. 173-182.

71. Крамаров В.Н., Мазанов А.Л., Смолянинов В.В. Выявление второй сайт-специфической эндонуклеазы из *Xanthomonas holcicola* и ее характеристика. // Биоорганическая химия, -1982.-Т. 8.-N.2.-с.220-223.

72. Бунина З.Ф., Крамаров В.М., Мазанов А.Л. и др. Bbv II новая сайт-специфическая эндонуклеаза из *Bacillus brevis* 80. // Биоорганическая химия, -1983.-Т.9.-III.-с.1578-1580.

73. Yamada Y., Yoshioka H., Sasaki J. et al. Purification, properties and recognition sequence of site-specific restriction endonuclease from *acetobacter liquefaciens*. // J. Gen. Appl. Microbiol. - 1983.-29.-p.157-166.

74. Cruz A.K., Kidane G., Pires M.O. et al. An *Sau3A* I restriction endonuclease isoschizomer from *Bacillus cereus*. // FEBS. -1984.-V.173.-N.1.-p.99-102.

75. Крамаров В.М., Мазанов А.Л., Пачкунов Д.М. и др. Вторая сайт-специфическая эндонуклеаза из *Rhodopseudomonas sphaeroides*. // Биоорганическая химия, -1984.-Т. 10.-N.1.-с.46-49.

76. Бунина З.Ф., Крамаров В.М., Смолянинов В.В. и др. Xph I новая сайт-специфическая эндонуклеаза из *Xanthomonas phaseoli*. // Биоорганическая химия, -1984.-Т.10.-III.-с.1333-1335.

77. Mise K., Nakajima K. Isolation of restriction enzyme Eco VIII, as isoschizomer of Hind III, produced by *Escherichia coli* E 1585-68 // Gene. 1984.-30.-p.79-85.

78. Prangishvili D.A., Vashakidze R.P., Chelidze M.G. et al. A restriction endonuclease Sua I from the thermoacidophilic archaebacterium *sulfolobus acidocaldarius*. // FEBS Lett. -1985.- V.192.-N.1.-p.57-60.

79. Takahashi H., Kojima H., Saito H. A new site-specific endonuclease, *Sea* I, from *Streptomyces caespitosus*. // Biochim. J. -1985.- V.231.-p.229-232.

80. Weide L., Shouyi C. Hsa I: a restriction enzyme from human being. // Scientia Sinica. -1986.-V. XXIX.-N.9.-p.947-953.

81. <http://www.chem.msu.ru/teaching/biotech/all.pdf>

82. <https://rd2mgn74.ru/serdtse/chfo-znachit-analiz-krovi-na-rw.htm>

83. <https://clinicalgate.com/agglutination-methods/>

84. <https://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/microbiology/stu/bacter/microscop.htm>

85. <https://rostec.ru/news/bakteriofagi-meditsina-budushchego/>

86. <https://quizlet.com/129828233/blood-elements-flash-cards/>

87. <https://studfile.net/preview/5810976/page:35/>

88. <https://studfile.net/preview/5602954/page:40/#116>

89. [https://www.metrohm.com/ru-ru/products-](https://www.metrohm.com/ru-ru/products-overview/ion_chromatography/940-professional-ic-vario/)

[overview/ion_chromatography/940-professional-ic-vario/](https://www.metrohm.com/ru-ru/products-overview/ion_chromatography/940-professional-ic-vario/)

90. <https://soctrade.ua/equipment/perkinelmer/elementnyi-analiz/aaspektrometry/PinAAcle900t/>

91. [http://www.lablife.com.ua/equipment/biotek-vumir-](http://www.lablife.com.ua/equipment/biotek-vumir-absorbicii/%D1%81ytation-3/)

[absorbicii/%D1%81ytation-3/](http://www.lablife.com.ua/equipment/biotek-vumir-absorbicii/%D1%81ytation-3/)

92. <http://biofile.ru/bio/4735.html>

93. http://e-lib.gasu.ru/eposobia/veronkov/R_1_2.html

94. <https://studfile.net/preview/6159858/page:5/>

95. <https://medi.ru/>

96. <https://www.medkurs.ru/>

97. <https://studfile.net/preview/2481879/>