

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятский государственный университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе
протокол заседания кафедры
№ _____ от _____
Заведующий кафедрой,
доктор медицинских наук, профессор
_____ И.В. Дармов

А.Н. Шевцов

Медицинская биотехнология

Курс лекций

Учебное пособие

Киров 2011

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебного пособия для студентов направления 020400 «Биология» всех профилей подготовки всех форм обучения

Шевцов, А. Н.

Медицинская биотехнология. Курс лекций: учебное пособие/
А.Н. Шевцов. – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 129 с.

Курс лекций предназначен для студентов направления 020400 «Биология» всех профилей подготовки для использования в качестве учебного пособия для самостоятельной работы при изучении дисциплины «Медицинская биотехнология».

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

Оглавление

Лекция №1 (вводная)	
Тема лекции: Медицинская биотехнология как научная дисциплина	5
Лекция №2	
Тема лекции: Производство бактериальных классических вакцин	14
Лекция № 3	
Тема лекции: Основы производство бактериальных вакцин (на примере кишечных вакцин) и препаратов для бактериотерапии	19
Лекция №4	
Тема лекции: Препараты для бактериотерапии	29
Лекция №5	
Тема лекции: Медицинская биотехнология и вакцины будущего	34
Лекция №6	
Тема лекции: Лечебно-профилактические антитоксические сыворотки. Организация сывороточного производства.....	45
Лекция №7	
Тема лекции: Очистка и концентрация гипериммунных антитоксических лошадиных сывороток	56
Лекция №8	
Тема: Основные методы контроля вакцинных препаратов.....	68
Лекция №9	
Тема лекции: Принципы контроля бактериальных и вирусных препаратов	75
Лекция № 10	

Тема лекции: Анатоксины технология получения	82
Лекция №11	
Тема лекции: Лечебно-профилактические бактериофаги	90
Лекция № 12	
Тема лекции: Получение антисывороток для диагностических целей	100
Лекция № 13	
Тема лекции: Диагностикумы для серодиагностики инфекционных заболеваний.....	106
Лекция 14	
Тема лекции: Иммунологические методы.....	113
Лекция 15	
Тема лекции: Молекулярно-генетические методы.....	122

Лекция №1 (вводная)

Тема лекции: Медицинская биотехнология как научная дисциплина

Биотехнология — это наука об использовании биологических процессов в технике и промышленном производстве. Название ее происходит от греческих слов *bios* — жизнь, *teken* — искусство, *logos* — слово, учение, наука. Медицинская биотехнология — это одна из составных частей биотехнологии, и ее развитие органически связано с биотехнологией в целом. К числу биологических процессов относят те из них, в которых применяют биологические объекты различной природы (микробной, растительной или животной), например, производство ряда продуктов медицинского, — антибиотики, вакцины, ферменты, диагностикумы, пробиотики и пр. Наука формировалась и эволюционировала по мере формирования и развития человеческого общества. Это, в частности, непосредственно относится и к медицинской биотехнологии. Ее возникновение, становление и развитие условно можно подразделить на 4 периода: эмпирический, этиологический, биотехнический и генотехнический. Эмпирический (от греч. *emperikos* — опытный) или доисторический период — самый длительный, охватывающий примерно 8000 лет, из которых более 6000 лет — до нашей эры и более 2000 лет — нашей эры. Древние народы того времени интуитивно использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива и некоторых других продуктов, которые теперь мы относим к разряду биотехнологических. К тому же эмпирическому периоду относятся: получение кисломолочных продуктов, квашеной капусты, медовых и виноградных алкогольных напитков, приготовление настоев лечебных трав.

Второй, этиологический (от греч. *aitia* — причина) период в развитии биотехнологии охватывает вторую половину XIX века и первую треть XX века (1856 — 1933 гг.). Он связан с выдающимися исследованиями великого

французского ученого Луи Пастера (1822 — 1895) — основоположника научной микробиологии и ряда микробиологических дисциплин (промышленной, медицинской, химической, санитарной). С аналитической микробиологией непосредственно связано открытие Пастером молекулярной асимметрии (стереоизомерии). Это, по существу, бриллиантовый век микробиологии. Пастер вскрыл микробную природу брожений, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, экспериментально опроверг представление о самопроизвольном зарождении живых существ, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии; предложил метод стерилизации, называемый по его имени пастеризацией и т. д.

Немеркнущая слава Пастера не затмила имен его выдающихся учеников и сотрудников: Э.Дюкло, Э.Ру, Ш.Э.Шамберлана, Ж.А.Вильемена, И.И.Мечникова. В этот же период творили Р.Кох, Д.Листер, Ш.Китазато, Г.Т. Риккетс, Д.И.Ивановский, А. Лаверан и другие.

Этиологический период знаменателен тем, что удалось доказать индивидуальность микробов и получить их в чистых культурах. Более того, каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.). По сути, с этого периода начинается развиваться медицинская биотехнология.

В 1933 году А.Клюйвер и Л.Х. Ц.Перкин опубликовали работу "Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов", в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке и интерпретации получаемых результатов при глубинном культивировании грибов. С этого времени начинается третий период в развитии биологической науки — биотехнический. Началось внедрение в биотехнологию крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечившего проведение процессов в стерильных условиях. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков (время второй мировой войны 1939 —

1945 г., когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами). Все прогрессивное в области биологических и технических дисциплин, достигнутое к тому времени, нашло свое отражение в медицинской биотехнологии. Следует отметить, что уже в 1869 г. Ф.Мишер получил "нуклеин" (ДНК) из гнойных телец (лейкоцитов); В.Оствальд в 1893 г. установил каталитическую функцию ферментов; Т.Леб в 1897 г. установил способность к выживанию вне организма (в пробирках с плазмой или сывороткой крови) клеток крови и соединительной ткани; Г.Хаберланд в 1902 г. показал возможность культивирования клеток различных тканей растений в простых питательных растворах; Ц.Нейберг в 1912 г. раскрыл механизм процессов брожения; Л.Михаэлис и М.Л.Ментен в 1913 г. разработали кинетику ферментативных реакций, а А.Каррел усовершенствовал способ выращивания клеток тканей животных и человека и впервые применил экстракт эмбрионов для ускорения их роста; Г.А.Надсон и Г.С.Филлипов в 1925 г. доказали мутагенное действие рентгеновских лучей на дрожжи, а в 1937 г. Г.Кребс открыл цикл трикарбоновых кислот (ЦТК); в 1960 г. Ж.Барски и др. впервые обнаружили соматические гибриды опухолевых клеток мыши. Накопленные научные факты стали побудительным мотивом для разработки способов крупномасштабного культивирования клеток различного происхождения. Это необходимо было для получения различных клеточных продуктов и самих клеток для нужд человека, и, прежде всего, в качестве или в составе лечебных и профилактических средств: пенициллина, стрептомицина, тетрациклинов, декстрана, ряда аминокислот и многих других веществ. К 1950 г. Ж.Моно (Франция) разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микробов; в 50-е годы вопросам практической реализации непрерывного культивирования микроорганизмов посвятили свои исследования М. Стефенсон, И. Малек, Н. Д. Иерусалимский и др.

Примерно за 40 лет третьего периода были решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования, в том числе главного из них — биореакторов. Это оборудование используют и в настоящее время.

Четвертый период в биотехнологии — генотехнический (от греч. genesis — происхождение, возникновение, рождение) начался с 1972 г. В этом году П.Берг со своими сотрудниками в США создали первую рекомбинантную молекулу ДНК. Однако следует отметить, что в 1969 г. Дж.Бекуит с коллегами выделил в химически чистом виде лактозный ген из кишечной палочки, показав тем самым возможность направленных манипуляций с генетическим материалом бактерий.

Естественно, что без фундаментальной работы Ф.Крика и Дж.Уотсона (1953) по установлению структуры ДНК было невозможным достигнуть современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и регуляции ДНК, выделение и изучение специфичных ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнологических процессов на основе генно-инженерных работ. В этом суть генотехнического периода.

Уже в 1982 г. поступил в продажу человеческий инсулин, выработанный кишечными палочками, несущими в себе искусственно встроенную генетическую информацию об этом гормоне. На таком же уровне или с близким к тому заделом находятся следующие генно-инженерные препараты: интерфероны, фактор некротизации опухоли (TNF), интерлейкин-2, соматотропный гормон человека и аналог его соматомедин Ц и другие.

Зная строение аппарата наследственности у разных организмов, удастся манипулировать не только нуклеиновыми кислотами, но и целыми хромосомами (хромосомная инженерия) и клетками (клеточная инженерия).

В течение последних 20 — 25 лет двадцатого столетия происходило бурное развитие медицинской биотехнологии и определились сферы при-

оритетного внедрения конкретных результатов биотехнологических разработок, и, как следствие, появилось такое понятие, как иммунобиотехнология (от лат. *immunus* — невосприимчивый). К медицинской биотехнологии относили те производственные процессы, которые завершались созданием с помощью биообъектов средств или веществ медицинского назначения (прежде всего профилактического или лечебного действия на организм человека). Это — антибиотики, некоторые витамины, коферменты и ферменты, отдельные микробные полисахариды — как самостоятельные препараты или вспомогательные вещества при создании различных лекарственных форм, аминокислоты, нуклеозиды и др.

Иммунобиотехнология объединяет производства вакцин, иммуноглобулинов крови, иммуномодуляторов, иммуномедиаторов, моноклональных антител и некоторых других препаратов. На основе иммунобиотехнологических процессов создаются также профилактические и лечебные средства, объединяемые под эгидой медицинской биотехнологии. Следовательно иммунобиотехнология представляется здесь частным случаем медицинской биотехнологии. Вместе с тем, иммунобиотехнологические процессы по целевым продуктам вышли за пределы медицинского назначения (например, в иммуноферментном анализе, иммуноблоттинге). В равной мере большинство ферментов (как и аминокислот или некоторых других продуктов) производится не для целей здравоохранения.

Особое место в медицинской биотехнологии занимает разработка и производство диагностических препаратов. Определение в сыворотке крови больных специфических, антител, получившее наименование серодиагностики, является одним из важнейших дополнительных методов распознавания некоторых инфекционных заболеваний. Однако имеющиеся в крови здоровых людей так называемые нормальные, а также анамнестические или прививочные антитела снижают ценность серодиагностики многих инфекционных заболеваний.

В качестве антигена для определения специфических антител

существуют разного рода диагностикумы, старейшим из которых является гомогенная взвесь убитых микробов, применяемая в реакции агглютинации в пробирках (реакции Видаля, Райта и др.) или на стекле (реакция Хеддлсона). В последние годы широкое распространение получили эритроцитарные диагностикумы, где антигены фиксированы на эритроцитах, которые используют в различных реакциях (РПГА и РТПГА). Существуют и так называемые антительные эритроцитарные диагностикумы для обнаружения антигенов. Отдельную группу составляют неспецифические антигены для серологической диагностики сифилиса, используемые в РСК и реакции флоккуляции.

Бактериальные диагностикумы и монодиагностикумы. Основным условием для изготовления диагностикумов, так же как и агглютинирующих сывороток, является тщательная подготовка и селекция производственных штаммов с отбором колоний в гладкой форме и преобладанием необходимого антигена. Это обеспечивает хорошую агглютинабельность диагностикумов, их специфичность и стабильность гомогенности микробных взвесей (Н. А. Хоменко, Г. Л. Родионова, 1962).

В зависимости от наших знаний об объективно существующем разнообразии антигенной структуры возбудителей инфекционных заболеваний постепенно повышается специфичность получаемых диагностических препаратов. В настоящее время из цельных микробных клеток готовят диагностикумы из бактерий, имеющих известную антигенную обособленность, тогда как другие препараты содержат антигены с преобладанием отдельных структурных элементов. Последнего достигают методом селекции штаммов и обработки бактерий соответствующими агентами.

Эритроцитарные диагностикумы. Новые возможности для серологической диагностики создает реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), которая основана на применении эритроцитарных диагностических препаратов. Последние представляют собой комплексное соединение

эритроцитов с антигенами или антителами, стабилизированное растворами формалина или лиофилизацией. Основное преимущество этих препаратов состоит в их высокой чувствительности, достаточной специфичности, демонстративности и простоте постановки реакций, быстроте получения результата.

Перспективы развития медицинской биотехнологии

В последнее время все мы имели возможность убедиться, что благодаря применению технологии рекомбинантных ДНК были достигнуты крупные успехи в медицине. Многие фирмы, например, весьма преуспели в разработке эффективных методов промышленного производства человеческого интерферона (для этого гены человека были клонированы в микроорганизмах). Отметим, впрочем, что многие и сейчас сомневаются в эффективности интерферона как противовирусного и противоопухолевого средства. Помимо гена интерферона были клонированы гены инсулина и гормона роста человека. Эти гены экспрессируются и в бактериях. В целях крупномасштабного производства были клонированы гены многих других белков человека, необходимых для диагностики или для лечения. Уже поступил в продажу полученный при помощи микробов инсулин человека, который используется в медицине. Большое значение имеет и разработка методов производства моноклональных антител.

Не приходится сомневаться, что все шире и шире в диагностике, терапии и при трансплантации клеток и тканей будут использоваться ферменты, а для терапии опасных, известных и вновь появляющихся болезней будут производиться новые виды антибиотиков.

К числу активно разрабатываемых, но не вышедших еще из «детского возраста» сфер применения биотехнологии, которые окажут, наверное, наибольшее влияние на развитие медицины и промышленности, относятся биоэлектроника и биоэлектрoхимия, в которых используется взаимодействие биологических, электрических и электронных систем. В последние годы

здесь достигнуты заметные успехи. Так, принципы электронной инженерии нашли применение при разработке инфузионных насосов, а также эффективных комплексных устройств, в которых используются биологические соединения, чаще всего ферменты или антитела, и различные типы электродов. Создан целый ряд чувствительных датчиков, например контролирующих содержание глюкозы (для применения в медицине) или же нервных газов (в военных целях). Действие большинства из разработанных на сегодня датчиков основано на улавливании продуктов действия ферментов. Для этого используются обычные электроды с иммобилизованной на них биологической системой. Новые подходы в этой области ставят своей целью создание более чувствительных и эффективных приборов и расширение сфер, их применения. В основе работы таких устройств лежит процесс прямого переноса электронов между электродами и окислительно-восстановительными центрами белков.

В ближайшие десять лет, по-видимому, поступят в продажу и другие датчики, позволяющие, например, определять содержание отдельных компонентов крови. Появятся и биоэлектронные иммуносенсоры, причем в некоторых из них будет использоваться полевой эффект транзисторов. На их основе предполагается создать относительно дешевые приборы, способные определять и поддерживать на заданном уровне концентрацию широкого круга веществ в жидкостях тела, что может вызвать переворот в диагностике.

Успешно развивается и направление, связанное с разработкой датчиков, основанных на использовании комбинации иммобилизованных, стабилизированных микроорганизмов и электродов.

Особенно ярко новейшие успехи биотехнологии проявляются в практической медицине главным образом потому, что их распространение из лабораторий в промышленность, а затем и в клинику происходит в последние годы удивительно быстро. Так, первые публикации об экспрессии гена инсулина человека в *E. coli* появились в 1979 г. Полученный на основе рекомбинантных ДНК инсулин человека был испытан на добровольцах, не

страдающих диабетом, в 1980 г., а уже в 1981 г. велись развернутые клинические испытания.

Крупные открытия в науке обычно делаются при разработке фундаментальных проблем. Последние достижения мед. биотехнологии, нашедшие применение в самых важных отраслях медицины, оказывают, и будут оказывать революционизирующее воздействие на диагностику, лечение и понимание основ патологии многих тяжелых заболеваний.

Лекция №2

Тема лекции: Производство бактериальных классических вакцин

В настоящее время для иммунопрофилактики инфекционных болезней людей имеется целый ряд вакцинных препаратов, которые различаются по виду, технологии производства, способу применения и эффективности (рис.).

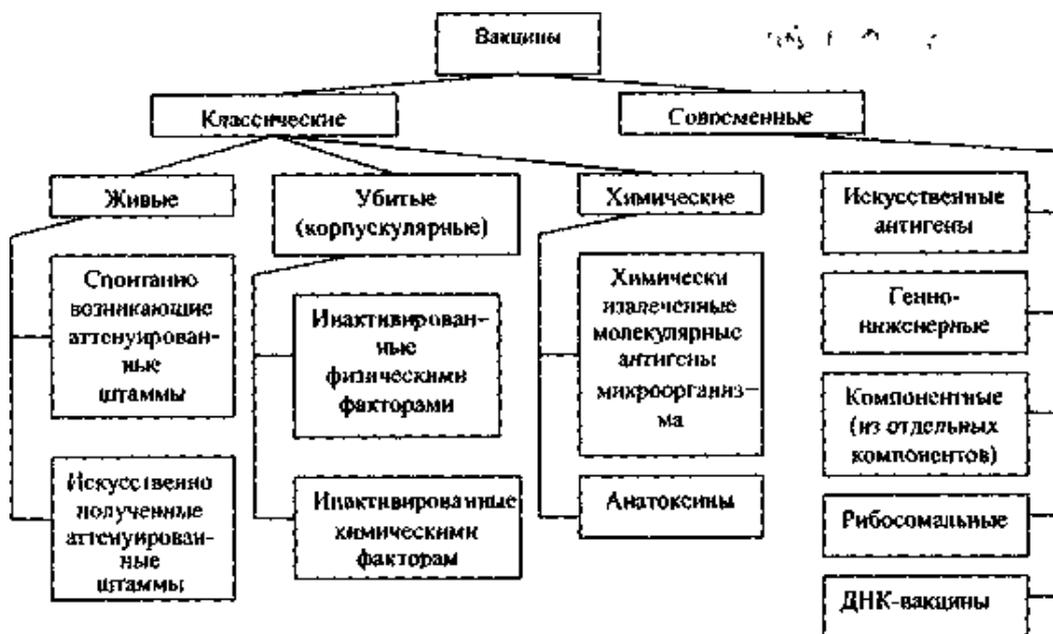


Рис. Классификация вакцин по характеру антигена и принципу его получения

Живые вакцины. Живые вакцины представляют собой иммунопрофилактические препараты, состоящие из наследственно измененных форм возбудителей инфекционных болезней - бактерий. Вакцинные штаммы микроорганизмов обладают остаточной вирулентностью, не способны вызывать специфические заболевания, но сохраняют способность размножаться и создавать активный иммунитет.

Анализ вакцинных штаммов микроорганизмов с позиций генетики позволяет определить их как формы, претерпевшие генетические изменения, в результате которых они безвозвратно потеряли способность вызывать в восприимчивом

организме клинические признаки болезни. Вместе с тем они сохранили протективные антигены, определяющие их способность индуцировать специфические иммуно-гические сдвиги. Реакцию организма на введение живой вакцины следует оценивать не как болезнь, а как вакцинальный процесс.

Используемые в живых вакцинах штаммы микроорганизмов с ослабленной вирулентностью называются аттенуированными.

Подбор аттенуированного штамма микроорганизма является первым этапом в создании живой вакцины. Для этого используются следующие пути:

1. Селекция спонтанно возникших мутантов (дивергентных линий) с ослабленной вирулентностью.

2. Искусственное получение аттенуированных штаммов возбудителей путем воздействия на геном возбудителя разнообразными методами:

а) путем длительного культивирования на искусственных питательных средах в неблагоприятных условиях;

б) путем перевода возбудителя на другой вид животного - восприимчивого или невосприимчивого (метод адаптации к новому хозяину);

в) путем непосредственного воздействия мутагеном на генетический материал бактерии или вируса физическими мутагенами (проникающей радиацией, ультрафиолетовым облучением, химическими соединениями - 5-бромурацилом, азотистой кислотой и др.), возможна обработка факторами биологической природы - иммунными сыворотками, бактериофагом, антибиотиками.

3 Искусственное получение генетических рекомбинантов, обладающих сниженной вирулентностью, но сохранивших иммуногенность.

Убитые корпускулярные вакцины. Убитые или инактивированные корпускулярные вакцины получают путем инактивирования возбудителя (бактерий) физическими (температура, ультрафиолетовые лучи) или химическими (формальдегид, фенол, ацетон, спирт, соли тяжелых металлов) методами с сохранением его физической структуры, т.е. корпускулярности. В соответствии с методом получения вакцин их называют гретыми, формалиновыми, ацетоновыми, спиртовыми, феноловыми и т.д.

Для получения убитых вакцин чаще используют высокопатогенные штаммы, полноценные в отношении вирулентности и антигенного строения, в т.ч. иммуногенность.

Процесс изготовления сухих корпускулярных вакцин состоит из следующих стадий:

1. Подбор штамма микроорганизма с полноценными свойствами и получение из него маточной культуры.
2. Выращивание биомассы.
3. Инактивация микробной взвеси.
4. Стандартизация.
5. Лиофилизация.

Кроме профилактических вакцин в клинической практике применяются и лечебные вакцины, предназначенные для лечения хронических инфекционных болезней. Такие вакцины получают в каждом отдельном случае специально из убитых бактерий, выделенных от данного больного

Химические (субъединичные) вакцины. Химические вакцины готовят из антигенов, извлеченных из микробной клетки тем или иным способом. К химическим вакцинам относятся также вакцины, полученные из растворимых дериватов микробной клетки, например токсинов. Химические (молекулярные) вакцины могут быть получены как методами биосинтеза, так и химическим синтезом. До сих пор в практике используется лишь биосинтетический метод, однако эксперименты последних лет показывают реальную возможность в ближайшем будущем на практике использовать химически синтезированные вакцины.

По иммуногенности современные химические вакцины уступают живым и убитым, однако в то же время они обладают неопределимыми преимуществами: нет опасности реверсии и они менее реактогенны и более стандартны.

Для создания химических вакцин необходимо, во-первых, расшифровать структуру микробной клетки, особенно специфичность антигенных структур. Благодаря развитию химии белков, молекулярной биологии, молекулярной

генетики, получены достоверные данные о структуре и функциях антигенов микробных клеток. Из микробных клеток выделяют так называемые протективные антигены -это иммунологически активные вещества, имеющие различную химическую природу, способные при введении в организм обеспечивать формирование специфического иммунитета, аналогичного иммунитету, индуцированному живыми микроорганизмами. Протективные антигены состоят из тех структурных элементов, которые обеспечивают патогенность микроорганизма, но в то же время определяют антигенность, иммуногенность и специфичность антигена.

Протективные антигены находятся или на поверхности микробных клеток (жгутики, капсула, ворсинки), или в цитоплазме, а также в клеточной стенке. Они могут быть также внеклеточными продуктами жизнедеятельности микробных клеток.

Антигенам, сосредоточенным в капсуле и клеточной стенке, принадлежит исключительно важная роль в стимуляции специфической устойчивости к инфекции. Доказано, что отдельные структуры клеток (жгутики, капсулы, клеточная стенка) более антигенны, чем извлеченные химическими методами комплексы, а протективная активность изолированных микробных субстанций определяется степенью ее нативности, т.е. макромолекулярной структурой, характерной для микробной клетки.

К химическим вакцинам относятся и анатоксины. Анатоксины представляют собой препараты, полученные из бактериальных экзотоксинов. Они полностью лишены токсических свойств под воздействием физических или химических факторов, но сохраняют антигенные и иммуногенные свойства.

Анатоксин, применяемый для активной иммунизации, является носителем информации, определяющей специфичность синтеза антитоксинов в иммунизируемом организме. Таким образом, выбор метода обезвреживания токсина имеет чрезвычайное значение.

В качестве детоксицирующего фактора широко используется формальдегид, а также окислители - тиазиновые и фталейно-вые красители (для детоксикации

столбнячного анатоксина), перекись водорода, аскорбиновая кислота и др. Из ряда предложенных депонирующих веществ (активированный уголь, крахмал, хлористый кальций, фосфат кальция и др.) в настоящее время применяются лишь гидрат окиси алюминия и фосфат алюминия, имеющие вид геля и обладающие сорбционной способностью в отношении белков.

Ассоциированными препаратами называют вакцины, состоящие из однородных антигенов - только из анатоксинов или только из бактериальных корпускулярных антигенов. Смешанные ассоциированные вакцины включают антигены различной природы.

Технологические линии, стадии и этапы производства

Промышленное производство биопрепаратов представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных физических, химических, биофизических, физико-химических процессов, и состоит из большого числа разнотипного оборудования, связанного между собой материальными, энергетическими потоками и образующих технологические линии.

Производство биопрепаратов осуществляется на технологических линиях.

Технологические процессы включают следующие операции:

1 Приготовление противобактериальных инактивированных вакцин:

- приготовление посевного материала;
- приготовление питательных сред;
- культивирование микроорганизмов;
- выделение и очистка препаратов;
- инаktivация микробной массы;
- контроль вакцины;
- лиофильное высушивание биопрепарата;
- фасовка (розлив) вакцины;
- укупорка и закатка флаконов (запайка ампул).

Лекция № 3

Тема лекции: Основы производство бактериальных вакцин (на примере кишечных вакцин) и препаратов для бактериотерапии

Кишечные инфекции характеризуются фекально-оральным механизмом передачи. Уровень заболеваемости регулируется в большей мере заражаемостью, чем иммунитетом населения. В связи с этими особенностями основное значение в борьбе с кишечными инфекциями приобретают санитарно-гигиенические мероприятия, способные разорвать или снизить интенсивность реализации механизма передачи инфекции. Вакцинопрофилактика является вспомогательным звеном в общей системе противоэпидемических мероприятий при борьбе с ними. Несмотря на резкое снижение заболеваемости брюшным тифом и паратифами в нашей стране, в отдельных районах она еще относительно велика, превышая в 3—5 раз средний. В связи с этим в локальных районах необходимо дифференцированное проведение вакцинопрофилактики с помощью высокоактивных вакцин.

Приемы и методы практической иммунологии, связанные с приготовлением и применением кишечных вакцин, существенно изменялись в зависимости от уровня научных представлений. Иммунологическая активность препаратов зависит от ряда факторов: свойств исходных культур, условий их выращивания; на искусственных питательных средах, методов обработки микробных взвесей и выделения из них протективных антигенов. Специфическая активность вакцин определяется прежде всего полноценностью их антигенной структуры (наличием протективных поверхностных антигенов: капсульного У1-антигена, соматического О-антигена и жгутикового Н-антигена), а также некоторыми патогенетически значимыми признаками, характеризующимися в опытах *in vitro* и *in vivo*. О- и VI-антигены играют основную роль в обеспечении антиинфекционного и антитоксического иммунитета, однако наибольшей эпидемиологической

эффективностью обладают те брюшнотифозные вакцины, которые наряду с O- и VI антителами индуцируют формирование H-антител.

В мировой практике для профилактики кишечных инфекций используют ряд вакцин, отличающихся по принципам получения (убитые — корпускулярные или химические и живые) и по методам проведения вакцинации (парентеральные, энтеральные, аэрозольные). В РФ регламентированы два типа тифо-паратифозных вакцин: корпускулярные (гретая и спиртовая, обогащенная VI-антигеном) и химические (тифозно-пара-тифозно-столбнячная вакцина *TABTe* и ее варианты). Для иммунотерапии применяются также дизентерийные вакцины.

Общая характеристика кишечных вакцин. В течение многих лет наибольшее распространение в мировой эпидемиологической практике имели гретые вакцины. Прогревание микробных взвесей в строго заданных условиях позволяло получать достаточно эффективные, хотя и высокоректогенные препараты. Гретые вакцины содержат большие количества O-антигена; в них имеются также VI- и H-антигены.

После того как было показано, что VI-антиген лучше сохраняется при стерилизации и консервировании микробных взвесей действием спирта, были предложены спиртовые вакцины. Обработка брюшнотифозных взвесей спиртом имеет преимущества перед прогревом или консервированием фенолом благодаря сохранению в вакцинах VI-антигена. Высокую эффективность спиртовых вакцин связывали прежде всего с наличием в них VI-антигена, однако было показано, что наряду с VI-антителами в крови привитых людей и животных достаточно активно накапливаются и O-антитела.

Исходя из представлений о том, что VI-антиген является ведущим протективным антигеном, обеспечивающим в комплексе с O-антигеном формирование у привитых полноценного иммунитета, многие авторы считали важным обеспечение наиболее высокой иммуногенной активности этих антигенов. Возник вопрос о повышении их содержания в вакцинных

препаратах. Для 0-антигена возможность повышения дозировки ограничена его высокой токсичностью, которую пока не удастся существенно понизить без повреждения иммуногенной активности. Что касается VI-антигена, то он может быть выделен в относительно нетоксичной высокоиммуногенной форме. Используя эту возможность, удалось разработать препараты вакцин, обогащенные антигеном, выделенным из брюшнотифозных культур.

Наряду с гретыми или спиртовыми брюшнотифозными корпускулярными вакцинами и спиртовой вакциной, обогащенной антигеном, во многих странах широко используют сухую корпускулярную ацетоновую вакцину, получаемую при инаktivации культур действием ацетона. Ацетоновая вакцина обладает O-, VI- и H-антигенной активностью. В строго контролируемых полевых эпидемиологических опытах, проведенных под эгидой ВОЗ, показано, что при сравнительном изучении гретой, спиртовой и ацетоновой брюшнотифозных вакцин наиболее эффективной оказалась последняя. Спиртовая вакцина уступала в этих опытах как ацетоновой, так и гретой. В связи с этим многими авторами высказаны серьезные сомнения в ведущей роли У1-антигена при обеспечении формирования поствакцинального иммунитета у людей.

В РФ для профилактики тифо-паратифозных заболеваний широко применяются химические вакцины, сконструированные из комплекса протективных антигенов, выделенных из микробных культур производственных штаммов соответствующих возбудителей. При выделении антигенных комплексов используется метод триптического протеолиза. Теоретически преимуществом химических вакцин является возможность использования изолированных антигенов, освобожденных от значительной части балластных компонентов микробной клетки, и более точное дозирование активной субстанции. В этих вакцинах облегчается возможность ассоциации антигенов, выделенных из нескольких возбудителей, при взаимном усилении иммунологической активности. Химические вакцины готовят в сорбированной форме; при этом наличие сорбента обеспечивает

проявление адьювантного эффекта и определенную степень функциональной детоксикации антигенов. Существенно уменьшается непосредственная реакция привитых на растворимые токсические продукты и одновременно возрастает длительность антигенного раздражения благодаря постепенной резорбции антигенов из созданного депо. Последнее обстоятельство позволило отказаться от двукратной иммунизации; должный защитный эффект достигается при однократном введении химических вакцин, что является их важным преимуществом.

В настоящее время в РФ регламентировано использование следующих кишечных вакцин: а) вакцины брюшнотифозной гретой;

б) вакцины брюшнотифозной спиртовой, обогащенной антигеном,;

в) вакцины тифопаратифозно-столбнячной химической сорбированной жидкой (ТАВ1е).

На примере этих препаратов мы разберем принципы производственной технологии изготовления кишечных вакцин.

Требования к производственным помещениям. При производстве вакцин необходимо использовать блок изолированных помещений. Стены и потолок должны быть выкрашены масляной краской или выложены плиткой, пол — выложен плиткой или покрыт линолеумом.

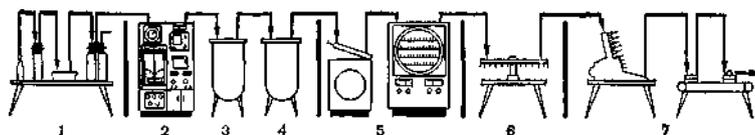


Рис. 1. Графическая схема технологического процесса производства брюшнотифозных корпускулярных вакцин.

1 — работа с производственным штаммом; 2 — накопление биомассы; 3 — инактивация нативной микробной взвеси; 4 — стандартное разведение; 5 — лиофильное высушивание препарата; 6 — запайвание ампул; 7 — этикетировка и упаковка готового препарата.

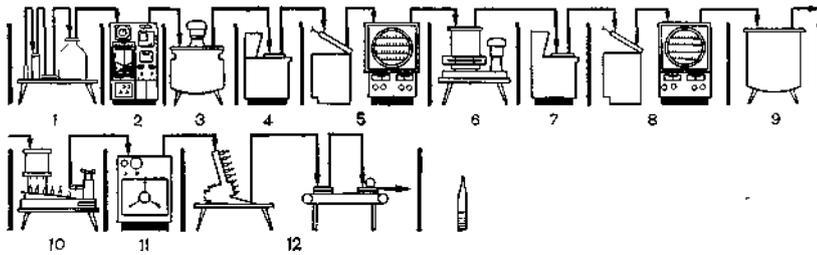


Рис. 2. Графическая схема технологического процесса производства VI-антигена брюшнотифозных бактерий.

1 — работа с производственным штаммом; 2 — накопление биомассы; 3 — инактивация нативов микробной массы; 4 — концентрация микробной массы центрифугированием, 5 — лиофильное высушивание микробной массы; 6 — экстрагирование U1-антигена, 7 — многократное пересаживание активной фракции, содержащей U1-антиген; 8 — лиофильное высушивание U1-антигена; 9 — стандартное разведение препарата; 10 — розлив и запаивание; 11 — стерилизация готового препарата, 12 — этикетировка и упаковка.

Помещения должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией. Для этой цели могут быть использованы фильтры типа ЛАИК или фильтры с фильтровальной тканью Петрянова. При нагрузке 36—50 м³ воздуха в час на 1 м² поверхности фильтра коэффициент «проскока» по микробным телам не должен превышать 0,01—0,005 %. Кратность воздухообмена должна составлять от 3 до 15 в час, в зависимости от особенностей и целевого использования помещений.

Помещения должны быть расположены в соответствии с последовательностью технологического потока. Так, при производстве химических вакцин функционируют: блок выращивания и ферментации, блок осаждения и диализа (при отсутствии централизованного отделения лиофильного высушивания), блок сведения вакцины и розлива, блок лиофильной сушки. Помещения, используемые по стадиям производства корпускулярных вакцин и при получении очищенного препарата VI-антигена брюшнотифозных бактерий, представлены на рис. 1 и 2.

Блок помещений, в котором осуществляется работа с живыми культурами, и обеспечивающая его система вентиляции должны быть полностью изолированы. В соответствии с характером технологических операций, проводимых в отдельных помещениях, последние должны быть оборудованы бактерицидными лампами БУВ из расчета 50 Вт мощности на каждые 10 м³ объема помещения. Производственные помещения должны иметь подводу горячей и холодной воды, газа, сжатого воздуха, вакуума; в части из них следует установить вытяжные шкафы. В бокс-реакторную с предбоксы должны быть дополнительно проведены: пар, дистиллированная вода и система для подачи бульона из отделения питательных сред. Производственное отделение должно располагать боксами для розлива вакцины, термостатными комнатами (на 37° и 40°С), автоклавами для обезвреживания заразного материала, помещениями для мойки и заготовки посуды. Отделению необходим также отдельно расположенный виварий для иммунизации и заражения подопытных животных.

Оборудование и аппаратное оформление. Промышленное изготовление кишечных вакцин требует использования на последовательных стадиях технологического процесса специальной аппаратуры и оборудования, комплектование которых производится в соответствии с конкретными условиями и объемом выпускаемой продукции. Отечественная промышленность поставляет относительно мало серийной аппаратуры, предназначенной специально для производства бактериальных препаратов. Рекомендуется подбирать и использовать оборудование, применяемое в химической, пищевой и других отраслях промышленности или конструируемое непосредственно на предприятии.

Оборудование должно соответствовать специальным требованиям бактериологического производства (возможность стерилизации, герметичность и т. п.), требованиям охраны труда и техники безопасности, а также обеспечивать должную поточность и возможность автоматического

контроля и регулирования технологических процессов в соответствии с современными техническими возможностями.

При выращивании культур и их ферментации необходимы: термостаты для подращивания, реакторы для производственного культивирования и ферментативного расщепления (марки РЗРП или РОР) с комплектом контрольно-измерительной аппаратуры.

При получении жидкого антигена применяются мерники (из нержавеющей стали или эмалированные), суперцентрифуги (СГО-100Х750), емкости для сбора центрифугата, охлаждаемый реактор для спиртового осаждения, ванна для диализа, лабораторные центрифуги.

Лиофильное высушивание антигена требует наличия морозильной камеры на -40 — 50°C , сушильных аппаратов (камеры ТГ-15, КС-30 и др.). При контроле сухого антигена необходимы весы технические и аналитические, сушильный шкаф-термостат (до 100°C , муфельная печь 300 — 900°C).

Для изготовления вакцины нужны: аппарат для получения апиrogenной воды, реакторы для сведения вакцины, нутч-фильтры фарфоровые, лабораторный рН-метр, центрифуга, микроскоп бинокулярный с иммерсией.

При получении лекарственной формы пользуются дозаторы для розлива и шюттель-аппарат для встряхивания, полуавтомат для закатки колпачков на флаконах, маркировочная машина по стеклу, холодильник «ЗИЛ».

Для массового изготовления корпускулярных вакцин необходимы: 1) реакторы для культивирования биомассы, реактор для инактивирования микроорганизмов прогреванием или мерники для обработки их спиртом; 2) емкости для стандартного разведения вакцин и дозаторы для ее розлива в ампулы; 3) морозильная камера (-50°C) и сушильные аппараты для лиофилизации вакцины в ампулах; 4) оборудование для отпайки ампул, контроля наличия в них вакуума, этикетировки и упаковки готового препарата; 5)

лабораторное оборудование — термостаты, рефрижераторы, сушильные шкафы, муфельные печи и т. д.

Технология приготовления препаратов. Производственные штаммы. При приготовлении вакцин брюшного тифа и паратифов применяют вакцинные штаммы соответствующих возбудителей. Их использование определяется «Инструкцией по отбору, проверке и хранению штаммов сальмонелл и шигелл, применяемых для изготовления вакцин против кишечных инфекций».

Производственные институты имеют право выделять и изучать штаммы для применения в качестве вакцинных при условии их последующей апробации в ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Этот институт снабжает другие институты эталонными штаммами, тест-культурами для заражения животных в опытах проверки иммуногенности и рабочими стандартами для испытания иммуногенности вакцинных штаммов.

Штаммы возбудителей брюшного тифа и паратифов А и В должны находиться в s-форме, иметь типичные морфологические, серологические и ферментативные свойства. В состав вакцин необходимо вводить штаммы, обладающие всеми антигенами, в том числе жгутиковый.

При введении брюшнотифозных штаммов рекомендуется применять отдельно VI- и V-формы.

Вакцинные штаммы, применяемые для изготовления вакцин против брюшного тифа и паратифов, должны быть вирулентными для белых мышей. Величина IB_{50} не должна у них превышать 50 млн. для брюшнотифозных и В-паратифозных бактерий при введении в изотоническом растворе хлорида натрия. Величина IB_{50} А-паратифозных бактерий не должна быть более 250 млн. при введении в изотоническом растворе хлорида натрия или 20 млн. при введении с 0,4% агаром.

Вакцинные штаммы должны обладать достаточно высокой иммуногенностью. Доза вакцины, защищающая 50% иммунизированных животных (EB_{50}) при заражении не менее чем 3 IB_{50} тест-культуры, должна

быть не выше 30 млн. при использовании В-паратифозных штаммов в условиях однократной иммунизации, для А-паратифозных штаммов — не выше 125 млн. в условиях двукратной иммунизации (приведена суммарная доза).

Штаммы возбудителей брюшного тифа и паратифов не должны быть высокоректогенными. Проверке на ректогенность подлежат все новые штаммы (в форме гретых вакцин). Испытание ректогенности осуществляют производственные институты на ограниченных группах людей (не менее 25 человек на каждую вакцину, приготовленную из нового штамма). В состав вакцины могут быть включены штаммы, ректогенность гретых моновакцин из которых не превышает 5% сильных и средних или 7 % только средних реакций.

Вакцинные штаммы надлежит хранить параллельно в производственной лаборатории и в музее культур производственного института в высушенном состоянии при температуре 4— 8°C. Высушиванию подлежат культуры относительно однородные в популяции по основным биологическим свойствам. Однородность культур в популяции устанавливают путем испытания не менее 10 субкультур одной и той же генерации, полученных из отдельных колоний, по:

1) морфологическим свойствам — морфологии колоний, морфологии микробной клетки, подвижности;

2) ферментативным свойствам. Проводят посевы на среды Гиоса, лакмусовое молоко, бульон Хоттингера, определяют сероводород и индол;

3) антигенной структуре. Вакцинные штаммы тифа и паратифов должны обладать всеми антигенами в соответствии с классификацией Кауфмана. Антигенную структуру проверяя в реакции агглютинации на стекле с монорецепторными агглютинирующими сыворотками одного института;

4) серологическим свойствам. Брюшнотифозные штамма проверяют с агглютинирующими брюшнотифозной А- и В-паратифозными сыворотками,

А- и В-паратифозные штаммы — с агглютинирующими А- и В-паратифозными и брюшнотифозной сыворотками. Высокая агглютинабельность брюшнотифозных штаммов, содержащих У-антиген, с поливалентной (ОН) сывороткой не обязательна при условии их агглютинабельности VI-сывороткой. У1-штаммы необходимо проверять на наличие 0-антигена с культурой, прогретой при 100° С в течение 1 ч;

5) вирулентности. Определение проводят на белых мышях

Лекция №4

Тема лекции: Препараты для бактериотерапии

Идея коррекционного воздействия на внутреннюю среду организма человека путем целенаправленного изменения состава симбиотической микрофлоры принадлежит основоположнику отечественной микробиологии И. И. Мечникову. Предложенный им метод энтерального введения живых культур молочнокислых бактерий в качестве антагонистов гнилостных микробов явился началом современных исследований в области бактериотерапии и профилактики различных патологических состояний, патогенетически связанных с нарушениями состава нормальной микрофлоры.

Препараты из живых бактерий-симбионтов получили весьма широкое распространение во многих странах и сфера их применения неуклонно растет. Такие препараты назначают для восстановления облигатной микрофлоры после длительного лечения антибиотиками и туберкулостатическими препаратами (в том числе после операций на желудочно-кишечном тракте, после курсов лучевой терапии, при гастритах анацидного и субацидного типа, гастроэнтеритах, колитах, в том числе постдизентерийных и язвенных), кишечных дисфункциях в гериатрической практике и у детей, при некоторых аллергических состояниях, вторичных дерматозах и т. д. Неоспоримым преимуществом препаратов этого типа перед эубиотиками химического ряда является их физиологичность для организма человека и связанная с нею полная безвредность.

В связи с высокой лекарственной устойчивостью возбудителей некоторых кишечных инфекций усилился интерес к разработке схем терапии с максимальным ограничением антибиотиков и заменой их сочетанием химио- и биопрепаратов.

Новая область применения бактериальных препаратов открылась в последние годы в связи с развитием космической медицины и космической

микробиологии. Сдвиги в составе симбиотической микрофлоры человека вплоть до состояния «микробного шока» требуют разработки эффективных биологических средств для принятия своевременных коррекционных мер. Это относится к контингентам людей, находящимся в так называемых экстремальных условиях во время длительных космических полетов, в условиях относительной или полной изоляции в антарктических экспедициях, экипажах подводного флота и т. д.

При столь широкой сфере применения бактериальных биопрепаратов мнения исследователей о степени их эффективности при разных формах заболеваний и самом механизме действия весьма разноречивы. Этим можно отчасти объяснить значительное многообразие состава и форм препаратов данного типа, предлагаемых практике. Примечательно, что в каждой из стран, применяющих препараты из бактерий нормальной микрофлоры, последние различаются по видовому составу и свойствам культур, набору входящих в них штаммов, формам выпуска и способам введения в организм. Так, в числе иностранных бактериальных монопрепаратов, содержащих в качестве действующего начала кишечную палочку, известны мутафлор — нативная взвесь живых бактерий в капсулах из задубленного желатина (довоенная Германия), севакол — лиофилизированная культура кишечной палочки (Чехословакия), колифлорал — таблетки из лио-филизированной микробной массы (Австрия), а также препарат, запатентованный под № 1275М (Франция) в форме нативной бульонной культуры в ампулах. Среди монопрепаратов, получаемых на основе сухих культур бифидобактерий, можно назвать лиобифидус (Франция), эугален (Швейцария, Австрия), а также составы, запатентованные под № 2134179 (ФРГ), 1061894 (Англия) и др. Довольно широко распространены лечебные препараты из бактерий молочнокислой группы и др. Таковы нормофлор в твердых капсулах и гастрофарм в таблетках, получаемые на основе сухих культур болгарской палочки (Болгария), а также лактази, представляющий собой живую культуру ацидофильных лактобактерий в ампулах (Италия), и др. В ряде

стран находят применение лечебные препараты из живых культур *Vac. subtilis*, расфасованные в ампулы или твердые желатиновые капсулы, — бактисубтиль (Франция) и др.

Ширится распространение комплексных биопрепаратов, содержащих микроорганизмы двух и более систематических групп. Примером двухкомпонентного бактериального препарата может служить колифплюс — лиофилизированная культура *E. coli* и *B. sp.* во флаконах (Франция), а поликомпонентных — омнифлора, представляющая собой лиофилизированную культуру бифидобактерий, ацидофильной и кишечной палочек, расфасованную в кислотоустойчивые твердые капсулы, французский биолактиль, включающий смесь живых микроорганизмов молочнокислой группы и выпускаемый в жидком виде (ампулы, флаконы) или в лиофилизированной форме (порошок, таблетки), а также запатентованный под № 3626М состав, содержащий наряду с молочнокислыми микроорганизмами групп кишечной палочки, клостридий и др., фасуемый в желатиновые капсулы. Хотя целесообразность столь значительного усложнения состава препаратов является спорной, сама по себе идея одновременного воздействия на различные звенья нарушенного бактериоценоза заслуживает внимания. В свете современных данных о важном физиологическом значении для макроорганизма микробного биоценоза в целом, а не отдельных бактериальных видов именно комплексные биопрепараты, рационально сочетающие в себе важнейшие компоненты облигатной кишечной флоры, должны обеспечить наиболее успешное решение задач восстановительной терапии при различных формах патологии, обусловленной дисбактериозом.

В Советском Союзе работами Л. Г. Перетца (1955) и его школы убедительно показана эффективность колибактерина при заболеваниях, протекающих на фоне дисбактериоза кишечника, и заложены основы разработки биопрепаратов из других бактерий — представителей симбиотической микрофлоры человека. Важным этапом усовершенствования биопрепаратов из живых бактерий нормальной микрофлоры явилась

разработка способов их высушивания. Освоение метода лиофилизации в технологии бактериальных биопрепаратов создало условия для получения высокоустойчивых форм, выдерживающих хранение в течение нескольких месяцев и лет.

Понимание механизма действия бактериальных биопрепаратов во многом связано с представлениями о сущности антагонистических взаимоотношений между микробами облигатной флоры и представителями патогенных видов. Однако проблема в целом значительно более сложна ввиду необходимости учитывать роль защитных сил макроорганизма, на фоне которых проявляются полезные свойства бактерий, вводимых в расчете на лечебный эффект.

Существенную роль в проявлении лечебного действия бактериальных биопрепаратов наряду с антагонистической активностью штаммов играют их витаминообразующие, ферментативные и иммунизирующие свойства.

Рядом исследователей препараты из бактерий симбиотической микрофлоры рассматриваются как эффективное средство профилактики кишечных заболеваний, хотя целесообразность их применения в данной области является в настоящее время дискуссионной.

С современных позиций нормальная микрофлора-микробиота – рассматривается как качественное и количественное соотношение популяций микробов отдельных органов и систем, поддерживающих биохимическое, метаболическое и иммунное равновесие организма хозяина, необходимое для сохранения здоровья человека. В проявлении антагонистической активности нормальной микрофлоры независимо от факторов ингибирования могут быть лизоцим (мурамидаза) перекись водорода, антибиотикоподобные субстанции-бактериоцины, обладающие подавляющим действием на патогенные и условно патогенные микроорганизмы. Продукция ряда ферментов, особенно бета-галактозы, ферментирующей лактозу объясняет высокую эффективность препаратов из бифидобактерий и лактобацилл для предотвращения или лечения лактозной недостаточности. Известны

иммуномодулирующие свойства этих бактерий, способных воздействовать на различные звенья иммунной системы, регулируя специфический и неспецифический и клеточный и гуморальный иммунитет.

Пробиотики- это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина через оптимизацию и стабилизацию его микробиоты. В РФ находят применения следующие группы препаратов-пробиотиков.

Бифидосодержащие препараты. Действующим началом их являются живые бифидобактерии, которые обладают антагонистической активностью против широкого спектра патогенных микроорганизмов.

Бифидумбактерин. Препарат выпускается в сухом виде, во флаконах, в ампулах, в таблетках, в порошке, в капсулах и в свечах. Для изготовления лекарственных форм используют микробную массу живых бифидобактерий, лиофильно высушенную в защитной среде, одна доза препарата 10^8 в 8 степени— 10^7 в 7 степени живых клеток.

Лекция №5

Тема лекции: Медицинская биотехнология и вакцины будущего

В среднем через каждые 1—2 года мировая практика вакцинопрофилактики получает по одной новой вакцине и несколько модифицированных вакцин. В России производится 42 вида вакцин, а с учетом разных вариантов — 75.

Многие существующие вакцины, сохраняя свои названия, совершенствовались на протяжении десятилетий и сейчас значительно лучше своих первоначальных вариантов. Вместе с тем все без исключения вакцины (отечественные и зарубежные) имеют недостатки и нуждаются в дальнейшем совершенствовании.

Современная вакцинология стремится к созданию идеальных вакцин. Большинство существующих вакцин не могут быть основой для создания таких вакцин, нужны принципиально новые подходы, основанные на использовании знаний о клеточных и молекулярных механизмах развития иммунитета, точных данных о структуре антигенов и кодирующих их генов, на применении современных методов биотехнологии, компьютерного анализа при подборе потенциальных эпитопов и расчете интенсивности и характера иммунного ответа [2—6].

Требования к идеальной вакцине

1. Химический состав и структура компонентов вакцин (антигенов, адъювантов, носителей и пр.) должны быть точно установлены.
2. Вакцина должна вводиться один раз.
3. Вакцина должна быть комплексной и создавать иммунитет ко многим инфекциям.
4. Вакцина должна обеспечивать пожизненный иммунитет 100% привитых.
5. Вакцина должна быть безопасной и не оказывать побочное действие.

6. Вакцина должна вводиться удобным для медицинского персонала и пациентов методом.
7. Вакцина должна быть стабильной, иметь длительный срок хранения.
8. Вакцина не должна нуждаться в соблюдении "холодовой цепи".
9. Технология изготовления вакцин должна отвечать современным требованиям.
10. Стоимость вакцины не должна быть высокой.

1. Генно-инженерные вакцины

Рекомбинантная технология совершила прорыв в создании новых вакцин. Принцип создания генно-инженерных вакцин заключается в том, что в геном живых аттенуированных вирусов, бактерий, дрожжей или клеток эукариотов встраивается ген, кодирующий образование протективного антигена того возбудителя, против которого будет направлена вакцина.

Для создания живых вирусных вакцин используют аттенуированный ДНК-содержащий вирус, в геном которого встраивается необходимый предварительно клонированный ген. Вирус, носитель вектора, активно размножается, а продукт встроенного гена обеспечивает формирование иммунитета. Вектор может содержать несколько встроенных генов, обеспечивающих экспрессию соответствующих чужеродных антигенов [7, 12].

Векторные вакцины на основе вируса осповакцины получены против ветряной оспы, гриппа А, гепатитов А и В, инфекции, вызываемой синцитиальным респираторным вирусом, малярии, простого герпеса. К сожалению, вакцины испытаны преимущественно на животных, которые устойчивы к большинству из этих инфекций.

У низших эукариотов посттрансляционные процессы занимают среднее положение. Принципы создания бактериальных рекомбинантных вакцин аналогичны. Важным этапом является клонирование генов и получение

мутантных генов, кодирующих иммуногенные, но не токсические формы антигена. Клонированы гены для дифтерийного и столбнячного токсинов, токсина синегнойной палочки, сибиреязвенного, холерного, коклюшного, шигеллезного токсинов. Предпринимаются попытки получить рекомбинантные вакцины против гонореи, менингококковой инфекции, малярии, коклюша [11, 15].

В качестве носителя бактериального вектора используются БЦЖ, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*. Кишечная группа возбудителей перспективна для разработки энтеральных вакцин. Живые рекомбинантные вакцины, введенные через рот, имеют короткий период жизни, но способны за этот период вызвать стойкий иммунитет. Возможно создание многокомпонентных вакцин для одноименной профилактики против нескольких диарейных инфекций. Бактериальные векторные вакцины в отличие от вирусных можно контролировать с помощью антибиотиков. Прошли экспериментальную проверку оральные вакцины против гепатита В и малярии.

2. Синтетические пептидные вакцины

Идея использования синтетических пептидов в качестве вакцин родилась при изучении клеточных и молекулярных механизмов развития иммунитета, прежде всего исследовании начальных этапов развития иммунитета — процессинга антигена во вспомогательных клетках и презентации антигена Т-клеткам.

В 1974 г. М. Села впервые описал искусственно полученный пептид, вызывающий образование антител к яичному лизоциму. При определенных условиях синтетические пептиды могут обладать такими же иммуногенными свойствами, как и естественные антигены, выделенные из возбудителей инфекционных заболеваний.

Для получения хорошего иммунного ответа необходимо, чтобы синтетический антиген содержал не менее 8 аминокислотных остатков, хотя в структуру антигенной детерминанты могут входить 3—4 аминокислоты. Минимальная молекулярная масса такой детерминанты составляет около 4000 кД.

Синтезированы и испытаны полисахариды, аналогичные естественным антигенам, например сальмонеллезным полисахаридам. Молекула синтетических вакцин может содержать разнородные эпитопы, которые способны формировать иммунитет к разным видам инфекций.

Экспериментальные синтетические вакцины получены против дифтерии, холеры, стрептококковой инфекции, гепатита В, гриппа, ящура, клещевого энцефалита, пневмококковой и сальмо-неллезной инфекций.

Синтетические пептиды обладают слабой им-муногенностью. Для их стабилизации, доставки к иммунокомпетентным клеткам и стимуляции иммунного ответа необходим носитель или какой-либо другой адъювант. Носитель не только помогает пептиду, он способен индуцировать ответ на себе, который не должен доминировать над ответом к пептиду и нарушать его специфичность.

У синтетических пептидов нет недостатков, характерных для традиционных вакцин (реверсия патогенных свойств, остаточная вирулентность, неполная инактивация и т. п.). Синтетические вакцины отличаются высокой степенью стандартности, они безопасны, обладают слабой реактогенностью. Есть все основания считать, что в будущем синтетические пептиды будут применяться в качестве вакцин.

3. ДНК-вакцины

В настоящее время интенсивно разрабатываются вакцины из плазмидных ДНК, кодирующих протективные антигены возбудителей инфекционных болезней. Такая ДНК, введенная внутримышечно животному, проникает в ядро клетки, длительное время существует вне хромосом без

репликации, транскрибируется и экспрессирует соответствующие антигены, вызывающие в организме привитого формирование иммунитета. Для приготовления вакцины может использоваться смесь ДНК, которая обеспечивает образование целого комплекса антигенов в нативном виде. Внутриклеточное образование антигенов создает хорошие условия для их взаимодействия с антигенами гисто-совместимости классов I и II, что ускоряет развитие иммунитета, который проявляется в образовании антител и появлении устойчивости к введению инфекционного агента. ДНК-вакцины индуцируют Т- и В-клеточный иммунитет, однако многие механизмы иммунного ответа на ДНК-вакцины остаются неизученными.

ДНК-вакцины могут быть получены в большом количестве, они стабильны и лишены инфекционных агентов. Перспективным направлением является разработка многокомпонентных вакцин, содержащих две или несколько плазмидных форм, которые кодируют разные антигены, цитокины или другие биологически активные молекулы.

На животных изучены вакцины из ДНК вирусов приобретенного иммунодефицита человека, гриппа, бешенства, лимфоцитарного хориоменин-гита, гепатитов В и С, простого герпеса, папилломы, а также возбудителей малярии, лейшманиоза, туберкулеза [7, 11].

Проблемы безопасности при разработке вакцин из плазмидной ДНК являются наиболее важными.

1. Прежде всего следует исключить онкогенную опасность. Еще недостаточно изучено, может ли вводимая ДНК встраиваться в геном клетки человека и давать мутагенный эффект.

2. Длительная экспрессия антигена может вызывать иммунопатологические реакции. Образование антигена в организме может продолжаться несколько месяцев. В связи с этим возможно развитие различных форм иммуносупрессии и других патологических явлений.

3. Использование генов, кодирующих цитокины или другие костимулирующие молекулы, связано с определенным риском. Некоторые

цитокины в высоких концентрациях могут вызывать различные формы патологии. Например, интенсивное образование провоспалительных цитокинов может спровоцировать длительный воспалительный процесс.

4. Чужеродная ДНК может вызывать образование анти-ДНК-антител, которые в силу перекрестных свойств способны индуцировать различные формы аутоагрессии и иммунопатологии.

5. Сам экспрессированный антиген может оказывать побочное биологическое действие.

Вакцины можно получать не только из ДНК, но и из РНК. Такие вакцины более безопасны в отношении бластомогенного эффекта, однако они нестабильны и вызывают кратковременный иммунитет. Производство РНК-вакцины более трудоемкое.

4. Антиидиотипические вакцины

Идиотипом называют сумму антигенных детерминант, расположенных в переменных областях цепей иммуноглобулина. У антител разной специфичности структура активных центров не одинакова. Эти различия и названы идиотипами, которые отличаются от видоспецифических, изотопических и аллотипических маркеров иммуноглобулинов. Аналогичные идиотипы существуют и на рецепторах Т-клеток.

Идиотипы способны взаимодействовать с антигеном и антиидиотипическими антителами. На этом основана идея создания антиидиотипических вакцин, имитирующих структуру необходимых антигенов. Для приготовления вакцин могут быть использованы как гомологичные, так и гетерологичные идиотипы. Экспериментальные вакцины на основе идиотипов получены против многочисленных возбудителей вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний. Вакцины безопасны, так как идиотипы являются естественными эндогенными продуктами иммунного ответа. Производство таких вакцин удобно в

тех случаях, когда трудно получить достаточное количество антигена и он слабоиммуногенен.

5. Вакцины, содержащие продукты генов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ)

Иммунный ответ к крупномолекулярным антигенам начинается с процессинга антигена вспомогательными клетками. Пептиды, образующиеся из антигена, не обладают выраженной иммуногенностью, но приобретают ее после взаимодействия с продуктами (антигенами) генов гистосовместимости класса I или II. Отсутствие таких продуктов является одной из основных генетических причин слабой иммунной реакции организма на вакцину. У каждой расы людей существуют свои аллели антигенов гистосовместимости, определяющие интенсивность иммунного ответа на отдельные протективные антигены возбудителей инфекционных заболеваний. Каждой инфекции соответствуют свой набор антигенов ГКГ, свои гаплотипы, ответственные за высокий или низкий уровень иммунитета [3].

С учетом этих положений фундаментальной иммунологии разрабатываются вакцины, рестриктированные по антигенам гистосовместимости, для лечения больных гепатитом В, цитомегаловирусной инфекцией и онкологическими заболеваниями (меланомой, раком простаты, папилломой). Вакцина, представляющая собой комплекс антигенов гистосовместимости класса I с антигенами вируса гепатита В, проходит клинические испытания. По предварительным данным, такая вакцина вызывает сильный ответ цитотоксических лимфоцитов и может способствовать усилению иммунитета у больных гепатитом В.

Разрабатываются другие варианты вакцин с учетом роли антигенов гистосовместимости в иммунном ответе.

Одна из важных проблем будущей вакцинологии — создание вакцин против опухолей. Введение онкологическим больным антител, как правило,

не приносит успеха, так как в основе противоопухолевого иммунитета лежат клеточные реакции. Постоянно испытываются различные варианты вакцин, в том числе вакцины, рестриктированные по антигенам гистосовместимости.

6. Растительные вакцины

Революционным направлением в современной вакцинологии является разработка вакцин на основе трансгенных растений. Впервые эта концепция была выдвинута в 1995 г. С. Arntzen и его группой [16]. Было показано, что листья трансгенных растений табака способны экспрессировать HBsAg. Полученный из растений и частично очищенный антиген, введенный мышам, вызывает иммунный ответ подобно вакцине против гепатита В. При скормливания мышам клубней трансгенного картофеля, который содержит гены, кодирующие синтез термолabile токсина (LT-B) кишечной палочки, происходит образование IgG- и IgA-антител к энтеротоксину *E. coli* [17].

Данные свидетельствуют о широкой перспективе в разработке и практическом использовании растительных вакцин. Оральный способ иммунизации является самым безопасным. Ассортимент пищевых источников растительных вакцин не ограничен. Немаловажное значение имеет высокая экономичность растительных вакцин с учетом того, что стоимость новых вакцин, например рекомбинантных, очень высокая.

7. Мукозальные вакцины

Пока нет универсальных методов вакцинации. В практике здравоохранения используется несколько способов введения вакцины: подкожный, внутримышечный, энтеральный, аэрозольный. Следует признать, что энтеральный способ вакцинации кажется самым перспективным [19]. При введении вакцин через рот можно получить имму-

нитет к любой инфекции. Энтеральные вакцины обладают низкой реактогенностью и слабой аллер-генностью. Они хорошо переносятся, их иммунологическая и эпидемиологическая эффективность не уступает аналогичным вакцинам, вводимым другим способом. Пероральный метод безопасен и прост, не требует специального оборудования и аппаратуры. Вакцинацию можно проводить в любых условиях, она лишена недостатков шприцевого и аэрозольного методов, отсутствует опасность передачи инфекций, она не вызывает отрицательных эмоций у прививаемых.

Достаточно высокая эффективность оральной холерной вакцины зависит от иммуногенных свойств холерного токсина (СТ), его нетоксической пентамерной субъединицы (СТ-В). СТ-В имеет перекрестные антигенные свойства с термолабильным токсином (LT-В) энтеротоксигенных *E. coli*. Иммунологическая активность СТ-В и LT-В объясняется их способностью связываться с рецепторами поверхности слизистой оболочки. На основе этих субъединиц разрабатываются вакцины для профилактики холеры и диареи [18].

Вместе с тем субъединицы СТ-В и LT-В можно использовать как носители и как средство доставки других видов антигенов. Принцип создания таких вакцин заключается в связывании (химически или генетически) антигенов или пептидов с СТ-В или LT-В. Сам антиген (или его пептид) в чистом виде при оральном способе введения может не работать, а его конъюгат с носителем вызывает сильную иммунную реакцию не только в месте его введения, но и на других участках слизистой (верхние дыхательные пути, уrogenитальный тракт и др.) и в лимфоидной ткани, не связанной непосредственно со слизистой.

В эксперименте на животных испытаны с положительным результатом мукозальные вакцины с антигенами стрептококка, вируса простого герпеса и других вирусов. Вакцины вызвали интенсивное образование IgA-антител, которые обнаруживались не только в секрете слизистой, но и в сыворотке крови. При интраназальной вакцинации людей рекомбинантным способом

СТ-В в секретах слизистых и сыворотке крови появляются IgA- и IgG-антитела в высоких титрах. Мукозальные вакцины обладают слабой реактогенностью, лишь при введении больших доз вакцины могут возникать побочные реакции (профузное выделение секрета из носа, зуд, чиханье).

Таким образом, все существующие в мире вакцины нуждаются в совершенствовании. Они далеко отстают от требований идеальной вакцины по основным ее параметрам эффективности и безопасности. Многие из вакцин, в том числе вакцины календаря прививок (АКДС-вакцина, БЦЖ, живая коревая вакцина и др.), вызывают сильные побочные реакции. Необходимы новые подходы к улучшению качества вакцин и разработке принципиально новых методов их получения.

Перспективными направлениями в современной вакцинологии являются: 1) разработка новых эффективных и безопасных адьювантов; 2) создание вакцин для физиологических (непарентеральных) способов иммунизации; 3) разработка комплексных вакцин.

В XXI веке тактика, видимо, будет сводиться к фронтальной, тотальной вакинопрофилактике всех имеющих важное значение в патологии человека инфекционных болезней. Для этого, конечно, требуются революционные достижения фундаментальной иммунологии и иммунобиотехнологии в создании средств и методов индукции невосприимчивости человека к патогенным микробам. Отметим наиболее важные направления и проблемы иммунобиотехнологии, которые будут решаться в XXI веке.

Во-первых, превалирующее значение в разработке вакцин нового поколения будут иметь синтетические и генно-инженерные молекулярные вакцины, а также векторные живые вакцины.

Во-вторых, существенное сокращение числа вакцинных препаратов, а следовательно, и процедур по их применению, возможно путем создания многокомпонентных поливакцин или объединения моновакцины в единый препарат.

В-третьих, вакцины будущего должны поступать в организм вакцинируемого наиболее щадящим и безопасным методом.

В-четвертых, уже начаты и будут развиваться ускоренными темпами исследования по созданию генных вакцин: ДНК-вакцин и вакцин, содержащих продукты генов гистосовместимости.

Эти взгляды и представления могут получить совершенно другой ракурс в случае грядущих, иногда непредсказуемых открытий, но в целом, как нам кажется, мед. биотехнология будет развиваться по пути, изложенному в данной лекции.

Лекция №6

Тема лекции: Лечебно-профилактические антитоксические сыворотки. Организация сывороточного производства

В настоящее время сывороточные производства построены в основном по одному принципу. Некоторые особенности, существующие в тех или иных институтах, зависят от местных условий и профиля предприятия.

Наиболее полно, как мы полагаем, отвечает современным требованиям следующая структура сывороточного производства (схема1). Иммунизационное отделение состоит из нескольких иммунизационных клиник, карантинной иммунологической клиники, изолятора, клинко-патоморфологической лаборатории, ветеринарной аптеки. В штат иммунологического отделения должны входить ветеринарные врачи (в том числе руководитель отделения), ветеринарные фельдшера, лаборанты-иммунизаторы, ветеринарные санитары, рабочие по обслуживанию лошадей-продуцентов, фуражиры.

Иммунизационные клиники возглавляют ветеринарные врачи, которые отвечают за ветеринарное обслуживание и состояние иммунного поголовья, за правильность выполнения технологических процессов по гипериммунизации и кровопусканию продуцентов и за выполнение производственного плана по получению от них крови. Под наблюдением ветеринарных врачей и при их непосредственном участии проводятся все операции с продуцентами (инъекции антигенов, кровопускания, взятие проб крови, лечебные процедуры, измерения температуры, ветеринарно-санитарные и противоэпизоотические мероприятия).

Иммунизационное отделение в целом выполняет задачу сывороточной эксплуатации лошадей-продуцентов (до получения от животных крови и передачи ее в отделение технической и химической обработки сыворотки), а также ветеринарно-санитарного и зоотехнического обслуживания их.

Отделение технической и химической обработки сывороток.

Иммунную и нормальную кровь получают из иммунологического отделения, производят ее техническую обработку (сепарируют или отсасывают вручную) до получения нативной плазмы или сыворотки. Затем очищают, концентрируют, стандартизируют, подвергают стерилизующей фильтрации и передают в цех розлива и фасовки.

Ведущие отделения (противостолбнячной, противодифтерийной, противогангренозной, противоботулинических и других сывороток) готовят антигены для гипериммунизации лошадей (в ряде случаев антигены изготавливают соответствующие отделения вакцино-анатоксического цеха), составляют схему специфической эксплуатации производителей (согласовывая вопросы эксплуатации иммунопоголовья со специалистами отделения иммунизации), проводят производственный контроль полуфабрикатов и готовой продукции, осуществляют выпуск препаратов, вплоть до сдачи их на склад, и несут ответственность за их качество.

Иммунизационное отделение, отделение технической и химической обработки сывороток и ведущие отделения тесно связаны в выполнении единого технологического процесса производства сывороток.

На тех предприятиях, где выпускают препараты холинэстеразы, соответствующее отделение входит в структуру сывороточного цеха.

Гипериммунизация. Как известно, для получения лечебно-профилактических сывороток применяется метод гипериммунизации животных, т. е. введения им нарастающих доз соответствующих антигенов с тем, чтобы добиться наивысшей ответной иммунологической реакции организма, а следовательно, и максимального нарастания в крови животного такого количества специфических антител, которое обеспечило бы способность сыворотки оказывать профилактический и лечебный эффект.

Более чем за 100-летний период развития сывороточного дела выявлено много факторов, положительно влияющих на получение

высокоактивных лечебно-профилактических гипериммунных сывороток. Среди них первостепенное значение имеют индивидуальные особенности животных, используемых в сывороточном производстве, и создание у них грундиммунитета с целью обеспечения предварительной иммунологической перестройки организма, методы гипериммунизации животных и применяемые при этом антигены и неспецифические раздражители, а также содержание и кормление животных в период эксплуатации. Разработке этих вопросов посвящена обширная специальная литература.

Для получения гипериммунных сывороток, помимо лошадей, испытывали овец, коз, мулов, ослов, крупный рогатый скот, свиней и даже собак. Эти исследования не дали желаемых результатов. В конечном итоге и в настоящее время лошадь как биологическая модель для получения гипериммунных сывороток остается общепризнанным продуцентом по комплексу показателей (высота титров антител, количество получаемой крови, ее обработка и выход сыворотки), и только этот вид животных в основном используют для эксплуатации в производственных масштабах. Даже очень серьезная аргументация, обосновывающая нецелесообразность широкого использования лошадиных сывороток ввиду широкой сенсбилизации населения к лошадиному белку, пока не позволяют преодолеть препятствия на пути использования других видов животных как основных продуцентов лечебно-профилактических сывороток.

Не все лошади, используемые в производстве гипериммунных сывороток, в равной степени оказываются полноценными продуцентами. Разнообразие внутренних причин, влияющих на способность организма к выработке антител, чрезвычайно велико, а их учет и изучение представляют большие трудности, которые обуславливаются индивидуальными особенностями организма. Не случайно в производстве сывороток часто бывают неудачи при гипериммунизации. При этом часть животных выбраковывают из числа продуцентов из-за их рефрактерности. Такая выбраковка может составлять 50% и более.

Отбор продуцентов для получения высокоактивных лечебных сывороток является весьма сложным делом, и его производят по основным показателям — физиологическим и иммунологическим.

По мнению многих исследователей и производителей, получение высокоактивных лечебно-профилактических сывороток связано с породой, конституцией, полом и возрастом лошадей.

Неоднократными наблюдениями (В. Д. Никитин, 1970) установлено, что по комплексу показателей лучшими продуцентами противостолбнячной и противодифтерийной сывороток являются 3-5 летние кобылы, затем — жеребцы, а худшими — меринь. Среди лошадей, иммунизируемых гангренозными антигенами, лучшие результаты оказываются у жеребцов, несколько худшие — у кобыл и плохие — у меринь.

Хотя многочисленные попытки связать интенсивность образования антител с такими факторами, как возраст, пол, порода иммунизируемых животных, привели к определенным положительным результатам при отборе лошадей для производства иммунных сывороток, все же наиболее теоретически обоснованным и практически целесообразным является отбор продуцентов по иммунологическим показателям.

В свое время широко применялся метод отбора лошадей— продуцентов для производства противодифтерийной сыворотки по титру естественного дифтерийного антитоксина в крови животных и по результатам реакции Шика. Часто такой отбор при постановке реакции Шика приводил к гибели животных из-за особой чувствительности лошадей к дифтерийному токсину.

Значительно-более ценны в прогностическом отношении попытки использовать степень нарастания титра антитоксина в результате иммунизаторного раздражения, предшествовавшего началу гипериммунизации.

Впервые искусственный грундиммунитет был создан у лошадей, предназначенных для производства противостолбнячной сыворотки. В дальнейшем предварительное грунди́рование получило распространение и при подготовке лошадей — продуцентов противогангренозных, противоботулинических, противодифтерийной и других сывороток.

Предварительное грунди́рование лошадей обеспечивает повышение титров специфических антител при последующей гипериммунизации тем же антигеном в 5 раз и более, увеличивает выход так называемых деловых продуцентов и создает условия получения сывороток в более короткие сроки. Решающее прогностическое значение при отборе лошадей для производства иммунных сывороток имеют результаты первого цикла гипериммунизации.

Учитывая большие затраты, связанные с содержанием лошадей в подготовительный период, грунди́рование и подготовительный цикл гипериммунизации, а также отбор более реактивных продуцентов целесообразно производить на месте заготовки в хозяйствах — поставщиках лошадей. При этом надо учитывать, что более отдаленное грунди́рование лошадей обеспечивает более интенсивное антителообразование при последующей гипериммунизации продуцентов. Эффективно грунди́рование лошадей столбнячным анатоксином в возрасте 1—2 лет с последующим использованием этих животных в качестве продуцентов соответствующей сыворотки в возрасте 3—4 лет. Оправдан отбор лошадей по динамике антителообразования в результате двукратного грунди́рования и ревакцинации.

Самые высокие титры сывороток получают тогда, когда в качестве продуцентов эксплуатируют лошадей, в подавляющем большинстве иммунологически подготовленных и отобранных по титру антитоксина на местах заготовки (В. Д. Никитин, 1970).

В комплексе специфической иммунизации лошадей — продуцентов антитоксических сывороток можно выделить три основных процесса, состоящих из отдаленного грунди́рования животных соответствующими

антигенами, подготовительных циклов гипериммунизации и последующих производственных циклов гипериммунизации.

В настоящее время применяют различные методы грунди́рования, в частности лошадей, предназначенных для производства противодифтерийной сыворотки. В Московском НИИВС имени И. И. Мечникова (В. Д. Никитин, 1970) грунди́рование производят путем подкожного введения двух доз нативного дифтерийного анатоксина (3 и 6 мл), эмульгированного в ланолине и растительном масле (2:1) с интервалом между инъекциями 21 день. В Ставропольском НИИВС грунди́ммунизацию выполняли путем введения 5 мл сорбированного и 20 мл нативного анатоксина с интервалом между инъекциями 21 день с одновременной аппликацией микродоз дифтерийного токсина (4 и 8 В1т) в той же последовательности.

Техника специфической эксплуатации лошадей-продуцентов.

Успех сывороточной эксплуатации зависит не только от подбора лошадей, применения качественных антигенов, рациональных схем гипериммунизации и условий содержания продуцентов, но и от техники выполнения схем иммунизации, кровопусканий и обескровливания животных.

Каждую лошадь до начала гипериммунизации таврят с присвоением очередного номера. Лучшим методом таврения, применяемым в Московском НИИВС имени И. И. Мечникова, является метод с использованием жидкого азота. На каждую лошадь заводят индивидуальную карту, в которой указываются номер лошади, краткая характеристика ее, результаты клинико-диагностических лабораторных исследований, заболеваний и лечения лошадей в процессе эксплуатации, а также обобщающие производственные данные по циклам гипериммунизации. Здесь же отмечают дату и причина обескровливания лошади. Кроме того, для повседневного учета производственной работы ведется иммунизационный журнал, в котором на каждую лошадь отведен один лист из расчета записей на 12 мес. В

иммунизационном журнале полностью отражаются весь ход иммунизации, кровопусканий, взятия проб крови, иммунологической реакции и состояние лошади (температура, отеки, инфильтраты и т. п.). Такой учет крайне необходим, так как без него невозможны анализ эксплуатационных возможностей лошади и определение дальнейшей схемы гипериммунизации.

Введение антигенов продуцентам при гипериммунизации осуществляют в основном подкожным и внутримышечным способами. Иногда прибегают к внутрикожному методу. Инъекции делают шприцем «Рекорд», шприцами для промывания полостей (типа Жане) и аппаратом Боброва.

У назначенной на иммунизацию лошади должны быть нормальная температура тела и общее хорошее состояние. Перед выполнением процедуры ее тщательно чистят, после чего заводят в специально оборудованный станок, расположенный в операционной, предназначенной для иммунизации животных, и тщательно фиксируют.

При производстве антитоксических сывороток (противостолбнячная, противодифтерийная, противогангренозная, противоботулиническая), как правило, антигены животным вводят подкожно. Местом для подкожных инъекций небольших доз антигена (5—25 мл) обычно служит шея лошади, а больших количеств — область спины.

Антиген необходимо вводить в несколько мест, так как при этом: 1) наблюдаются хорошая рассасываемость антигена и появление более равномерных и менее болезненных инфильтратов (объемистые инфильтраты чаще способствуют образованию абсцессов); 2) в иммуногенез вовлекается большее количество лимфатических узлов, что повышает общую иммунологическую реакцию организма. Заслуживают внимания исследования, проведенные в Московском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Институте эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи АМН РФ и Казанском институте эпидемиологии, микробиологии и гигиены, по изучению значения

дробного введения антигена с поочередным вовлечением в иммуногенез большого количества лимфатических узлов.

Внутримышечные инъекции антигенов производят чаще старым продуцентам, у которых снизились титры и в местах обычного введения антигенов в подкожной клетчатке произошло разрастание соединительной ткани, в связи с чем уменьшилось всасывание антигенов.

Техника кровопускания.

По окончании цикловой иммунизации, когда в сыворотке крови животного накопится максимальное количество специфических антител, у лошади берут кровь. Чаще это делают на 7-й день после введения продуценту последней дозы антигена. Количество забираемой крови зависит от живой массы лошади, привычки ее к кровопотерям (начальные циклы или последующие), количества предполагаемых кровопусканий в данном цикле, высоты титра антител и состояния здоровья животного. К взятию крови продуцентов надо приучать постепенно. Принято в первом цикле брать у лошадей крови на 30—35% меньше, чем у лошадей, уже прошедших 4—5 циклов эксплуатации. Во втором, третьем и четвертом циклах количество крови постепенно увеличивают. На трехкратные кровопускания животных переводят не ранее чем с 4—5-го цикла гипериммунизации. Более ранние интенсивные кровопускания отрицательно сказываются на стабильности титров антител в сыворотках продуцентов.

У приученной к кровопотерям лошади количество забираемой крови должно равняться $\frac{1}{50}$ живой массы, т. е. на каждые 50 кг массы получают 1 л крови, что при средней, чаще встречающейся живой массе продуцента 400—450 кг соответствует 8—9 л крови при первом кровопускании. При втором кровопускании (через 48 ч) берут на 1 л, а при третьем (через 48 ч после второго) — на 2 л меньше крови по сравнению с первым кровопусканием. Количество крови, которое предполагают взять, может быть снижено в зависимости от общего состояния животного, в частности состояния красной крови. Так, при содержании гемоглобина ниже 50% не следует назначать

лошади кровопускание. После кровопусканий продуценту предоставляется 2-недельный физиологический отдых, по окончании которого проводят очередную цикл гипериммунизации. Всего лошади служат продуцентами гипериммунных антитоксических сывороток в среднем 20 циклов, или 2 года.

Перед кровопусканием лошадь не кормят в течение 10—12ч и в первую очередь исключают концентрированные корма из утренней нормы. Таким путем устраняются мутность и общая хилезность плазмы и сыворотки. Назначенную на кровопускание лошадь подвергают измерению температуры тела и тщательной чистке, после чего ее заводят в станок специальной операционной. Кровь берут в области шеи из верхней трети яремной вены. После кровопускания лошадь заводят в стойло и сразу дают ей воды. Бутыли с кровью направляют в отделение технической и химической обработки сыворотки.

Техника тотального кровопускания.

Тотальные кровопускания лошадям производят тогда, когда на основании общего физиологического состояния животного, продолжительности его специфической эксплуатации, клинических данных и иммунологической реактивности делают заключение о нецелесообразности их дальнейшего использования в качестве продуцентов. Обычно это происходит в момент максимального накопления антител в крови животного. Тотальные кровопускания осуществляют в специальных помещениях, часто с использованием операционных столов. После фиксации животного и подготовки операционного поля вскрывают в области шеи сонную артерию, через которую и забирают всю кровь. Для получения большего объема крови лошади перед тотализацией вводят сердечные средства.

Содержание лошадей-продуцентов.

При заготовке и сразу после поступления на производство лошадей подвергают ветеринарно-санитарным исследованиям на инфекционные заболевания (см. ветеринарное законодательство, соответствующие

инструкции и технологическую документацию). Лошади должны быть совершенно здоровыми. Закупать их следует в хозяйствах, благополучных по инфекционным заболеваниям. После завоза на предприятие института их 45 дней выдерживают в карантинной иммунологической клинике. Иммунологическая клиника состоит из 6 секций и рассчитана на содержание 180 продуцентов. Кроме того, в ней имеются операционные для иммунизации, кровопусканий и лечебных процедур, душевые для персонала и для лошадей, комнаты отдыха, кабинет ветеринарного врача, помещение для хранения кормов и для их подготовки к скармливанию.

Обслуживание лошадей-продуцентов и выполнение производственных манипуляций с обязательным ежедневным измерением температуры тела животных осуществляют в соответствии с распорядком дня, утвержденным директором предприятия института. В процессе эксплуатации лошадей 2 раза в год подвергают клинико-лабораторным обследованиям на инфекционные заболевания в соответствии с положениями Ветеринарного законодательства, существующей инструкции и технологической документации по производству сывороточных препаратов.

Лошадей, заболевших или подозрительных на заболевание инфекционными болезнями, немедленно переводят в изолятор.

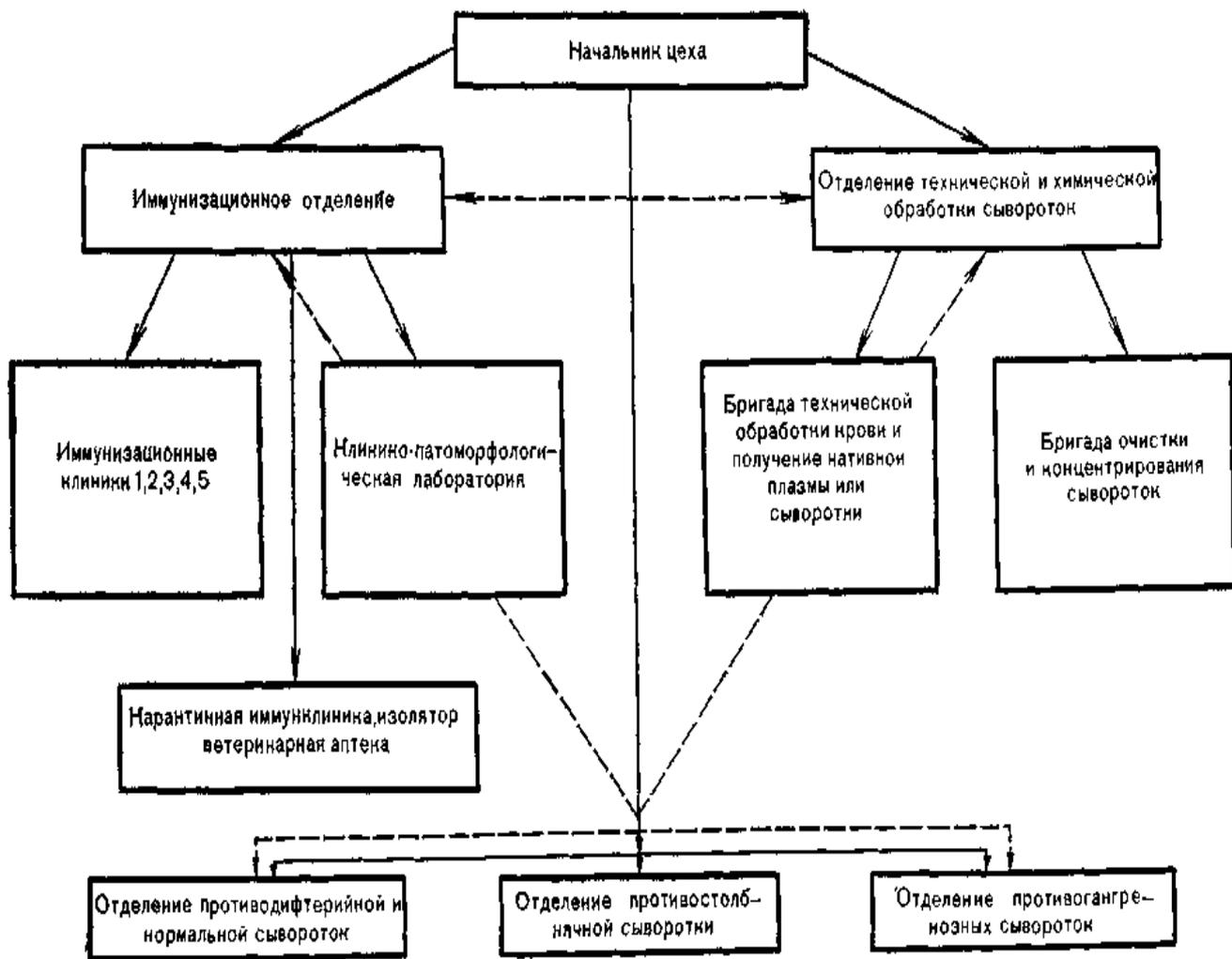


Схема 1. Организационная структура сывороточного цеха.

Лекция №7

Тема лекции: Очистка и концентрация гипериммунных антитоксических лошадиных сывороток

Важнейшей составной частью сыворотки крови являются белки, содержание которых в норме равно 6,5—8,5%. Основная масса белков сыворотки — это альбумины и глобулины. Альбумины составляют свыше 50% общего количества сывороточных белков, глобулины — около 40%. Значительная часть последних находится в комплексе с фосфатидами, углеводами, стероидами и др. Активность антител установлена только у глобулиновой фракции сыворотки, в которой методом электрофореза обнаружено пять отдельных видов глобулинов: $\gamma_1 - \gamma_2$ -, β -, α_1 - и α_2 - глобулины.

При гипериммунизации животных в сыворотке их крови возникают изменения, сопровождающиеся нарастанием общего белка и изменением соотношения белковых фракций: увеличивается содержание глобулинов и уменьшается относительное содержание альбумина. Если в нормальной лошадиной сыворотке альбумины составляют до 50% общего количества белков, то в антитоксической — не более 30—35%. Существенная перестройка затрагивает также глобулиновый спектр сывороток — γ и β глобулиновые фракции количественно увеличиваются, а фракции α -глобулинов относительно уменьшаются. Однако строгого параллелизма между увеличением глобулиновых фракций и накоплением антител в крови животных в процессе гипериммунизации не отмечается.

Белки, синтезирующиеся в организме в ответ на антигенное раздражение и обладающие активностью антител, в настоящее время обозначают термином «иммуноглобулины» (к иммуноглобулинам относят также миеломные белки, сходные с антителами по химической структуре и антигенной специфичности, белки Бенс-Джонса и субъединицы иммуноглобулинов).

При иммунизации лошадей белковыми антигенами получены два основных типа иммунологического ответа — так называемые антитоксический и антибактериальный.

В настоящее время невозможно осуществить селективный синтез какого-либо одного определенного вида антител при иммунизации животных. Однако на тип иммунологического ответа лошади и преимущественный синтез определенного класса антител могут воздействовать антигенный стимул, химическая природа антигенных детерминант, длительность интервалов между сериями инъекций, состав адъюванта и даже способ введения антигена. На свойства синтезирующихся антител оказывает влияние также длительность гипериммунизации лошади. Например, в процессе гипериммунизации возрастает даже электрофоретическая подвижность основной массы антитоксинов в противостолбнячных и противодифтерийных сыворотках.

Таким образом, антитела, синтезирующиеся в организме лошади, неоднородны и представляют собой иммуноглобулины, которые распределены среди белков всех фракций сывороточных глобулинов.

Изучение свойств отдельных белковых фракций сыворотки крови лошади показало, что все сывороточные белки обладают ярко выраженными антигенными и сенсibiliзирующими свойствами. Даже гомогенные фракции иммуноглобулинов способны сенсibiliзировать животный организм.

С целью удаления неактивных, балластных белков, повышения эффективности антитоксических сывороток и получения препаратов с высоким содержанием специфических антител применяют методы очистки и концентрирования.

Первые производственные методы очистки сывороток заключались в высаливании глобулиновой фракции сульфатом аммония и последующей очистке от неактивных белков и ионов солей.

Методы фракционной очистки сывороток с помощью солей или органических растворителей приводили к удалению части балластных белков и выделению антитоксических белковых фракций без нарушения строения белковой молекулы иммуноглобулинов. Применение для лечебных целей очищенных и концентрированных антитоксических сывороток, изготовленных этими методами, позволяло значительно уменьшать дозу вводимого белка. Однако реактогенность таких сывороток была очень высокой. Частота и тяжесть сывороточной болезни оставались на таком же уровне, как и при использовании нативных сывороток (А. В. Бейлинсон, 1954).

Значительное увеличение, степени очистки и снижение реактогенности антитоксических сывороток было достигнуто лишь при применении методов очистки и концентрирования, включающих стадию протеолиза сывороточных белков. В 1936 г. был разработан первый производственный метод с использованием для ферментативного расщепления сывороточных белков пепсина при рН 4,0—4,5, последующего высаливания ферментированных антитоксических глобулинов и удаления балластных веществ с помощью сорбента. В 1938 —1939 гг. началось широкое изучение механизма действия про-теолитических ферментов на сывороточные белки и антитоксины. Оказалось, что при ферментативном гидролизе большое значение имеют величина рН, температура, концентрация белка, а также природа, концентрация и качество применяемого фермента. Из протеолитических ферментов наибольшее распространение в технологии очистки сывороток получил пепсин. Роре (1938) выявил оптимальные условия проведения процесса протеолиза сывороточных белков пепсином и предложил проводить ферментативный гидролиз в течение 1 ч при рН 3,2 и комнатной температуре, а термолабильную часть балластных белков удалять нагреванием ферментированных сывороток до 55—57°C. Метод Роре позволил снизить потери антитоксина в процессе очистки и значительно увеличить концентрацию антител на единицу белка. В дальнейшем он

послужил основным прототипом производственных методов очистки антитоксических сывороток, разрабатываемых в разных странах.

В настоящее время разработаны достаточно эффективные производственные методы очистки и концентрирования лошадиных антитоксических сывороток. Наибольшее распространение получили комбинированные методы, включающие стадии ферментативного гидролиза, прогрева ферментированных сывороток в кислой среде, солевого фракционирования и дополнительной очистки от неактивных белков с помощью органических растворителей, сорбентов или длительного их выдерживания при пониженных температурах. При этом достигается удаление 80—85% балластных белков.

Применяемые методы различаются по условиям протеолиза и способам очистки антитоксина от неактивных белковых фракций и внесенного фермента.

Первый отечественный метод, известный под названием Диаферм (диализ, ферментация), был разработан А. В. Бешинсов и соавт. в 1943—1945 гг. В дальнейшем авторы усовершенствовали его, в результате чего в производственную практику были внедрены методы Диаферм-2 и затем Диаферм-3 Института эпидемиологии и микробиологии АМН РФ (А. В. Бейлинсон, 1954). С 1955 г. изготовление антитоксических лошадиных сывороток у нас в стране осуществляется по методу Диаферм-3. Благодаря простоте и достаточно высокой эффективности он получил широкое признание и в настоящее время применяется в качестве основного при изготовлении лечебных сывороток не только в РФ, но и в ряде зарубежных стран. За последние десятилетия метод Диаферм-3 был значительно усовершенствован. Метод Диаферм-3 (схема 2) включает стадии ферментативного гидролиза сывороточных белков пепсином в течение 1 ч при pH 3,2 и 1 ч при pH 4,2 при 22—24°C, термоденатурации (45 мин при pH 4,3 и 58°C в присутствии 14—14,5% сульфата аммония), высаливания активных глобулинов сульфатом аммония (34%) при pH 7,1, диализа и дополнительной

очистки диализата от балластных белков в их изоэлектрической точке при pH 5,2—5,6 в присутствии хлороформа (рис. 1). Длительность технологического процесса 6 дней.

Метод Диаферм-3 позволяет получать очищенные и концентрированные сыворотки с достаточно устойчивыми физическими и биологическими свойствами. Для стабилизации этих свойств очищенные сыворотки выдерживают в течение 3 мес. после чего в случае необходимости подвергают повторной фильтрации. Как правило, это относится к противодифтерийной и противоботулиническим сывороткам некоторых типов (В, Е и АВСВЕ), агрегатное состояние которых в процессе хранения меняется. При хранении свыше 6 мес. эти сыворотки мутнеют и в них появляется хлопьевидный осадок, состоящий в основном из балластных липоидсодержащих белков α -глобулиновых фракций. Титр антитоксина при хранении до 3 лет противодифтерийных, противогангренозных и противоботулинических сывороток снижается незначительно. Наиболее лабильны в этом отношении противостолбнячные сыворотки.

В качестве исходного сырья для изготовления очищенных сывороток может служить нативная сыворотка или плазма. Применение последней стало возможным благодаря включению в технологический процесс очистки стадии протеолиза сывороточных белков. Наилучшие очищенные сыворотки, имеющие соломенно-желтый цвет, устойчивые физические свойства и содержащие меньше балластных примесей, получают из плазмы плин сыворотки, предварительно очищенных от части неактивных белков. Для этого используют методы предварительного их фракционирования с помощью солей или этакридина лактата.

Антитоксическую гипериммунную лошадиную плазму получают на участке технической обработки крови методом сепарирования крови, содержащей 0,35% цитрата натрия. Выход плазмы из крови составляет 68—73%. Дальнейшую очистку и концентрирование плазмы производят на участке химической обработки сывороток.

Весь производственный процесс очистки и концентрирования сывороток осуществляется в условиях, максимально приближенных к стерильным, поэтому все рабочие комнаты должны представлять собой боксовые помещения с кафельными стенами, моющимися полами и быть снабжены бактерицидными лампами БУФ-15 или БУФ-30. Аппаратура перед работой стерилизуется текущим паром. Рабочие помещения располагаются по ходу технологического процесса таким образом, чтобы соблюдалась поточность операций.

Высаливание глобулинов, ферментативный гидролиз, прогрев и выделение основной антитоксической фракции производят в реакторах из нержавеющей стали, снабженных рубашками для обогрева и лопастными или рамными мешалками со скоростью вращения не более 60 об/мин. Для отделения белковых осадков на первой и второй стадиях очистки применяют фильтрацию через техническое полотно на кассетных фильтрах с последующим отжимом осадков на гидравлических прессах для более полного удаления надосадочной жидкости. Диализ проводят в ваннах из нержавеющей стали против тока охлажденной водопроводной воды, которую предварительно очищают от взвешенных и коллоидных частиц фильтрацией через толстый слой стекловолокна и угля. Сульфат аммония перед применением измельчают, сушат в сушильных шкафах и стерилизуют в автоклаве или в циклонной сушилке. Стирку фильтров из технического полотна производят на стиральных машинах барабанного типа с последующим отжимом на отжимных центрифугах. Все мелкое оборудование (бачки, мерники для кислот и щелочей и пр.) должно быть эмалированным или из нержавеющей стали.

Метод Дпаферм-3 обладает рядом существенных преимуществ перед применявшимися ранее методами солевого фракционирования и электродиализа. Он позволяет получать антитоксические сыворотки с более высокой удельной активностью и значительно менее выраженными анафилактогенными свойствами. При применении таких сывороток в

клинике значительно снизилось число случаев сывороточной болезни и тяжесть ее проявления (Ф. А. Черткова, 1965). Метод позволяет концентрировать антитоксин в 3,2—4,5 раза, выход активного белка составляет от 30 до 45%. В процессе очистки полностью удаляются белки альбуминовой фракции и большая часть α -глобулинов. Очищенные и концентрированные антитоксические сыворотки содержат основную белковую фракцию, располагающуюся в зоне подвижности 7-2 (Г)-глобулинов, в которой концентрируется до 90% антитоксина, и 1—2 дополнительные белковые фракции с подвижностью α -глобулинов. В последних сосредоточено до 5—8% общего белка сыворотки.

Однако наряду с несомненными преимуществами метод Диаферм-3 не лишен отдельных недостатков. Так, потери антитоксина в процессе очистки составляют 55—65% и более, неполностью удаляются неактивные белки, липопропротеиды и активный пепсин, длительный и сложный технологический процесс включает открытые стадии и стадии, оказывающие денатурирующее воздействие на сывороточные белки (прогрев в кислой среде, обработка хлороформом, диализ и др.). Наибольшие потери антитоксина (до 25—47%) имеют место на первой стадии — в процессе ферментации и термоденатурации. На заключительной стадии при диализе и обработке антитоксического диализата хлороформом потери активного белка достигают 20—30%. Денатурационные изменения структуры молекул сывороточных белков, возникшие под воздействием прогрева ферментированных сывороток в кислой среде в присутствии сульфата аммония, являются одной из причин снижения титра антитоксина в готовых сыворотках. Не выяснен также вопрос о значении остатков пепсина в очищенных сыворотках. Многие исследователи допускают, что в присутствии субстрата он может сохранять активность. Способы удаления ферментов при обработке сывороток и методы их надежной инактивации еще не разработаны.

Для получения сывороточных препаратов с более высокой удельной активностью в настоящее время наметились три направления: 1) усовершенствование метода Диаферм-3 или изыскание способов дополнительной очистки сывороток, изготовленных с помощью этого метода; 2) получение препаратов «чистых антител» методами специфической сорбции с применением иммуносорбентов; 3) создание усовершенствованных схем неспецифической очистки антитоксических глобулинов, в основном на основе применения сорбентов и ионитов.

Появилось несколько модификаций метода Диаферм-3, направленных на устранение отдельных его недостатков, но они не позволили значительно улучшить качество очищенных сывороток. Поскольку основными стадиями метода Диаферм-3, оказывающими неблагоприятное воздействие на молекулу сывороточного белка, являются тепловая денатурация и изоосаждение балластных белков в присутствии хлороформа, многие из них заключались в усовершенствовании именно этих двух стадий технологического процесса очистки.

В ряде институтов вакцин и сывороток создано несколько методов очистки, позволивших исключить из технологического процесса стадии термоденатурации и дополнительной обработки сывороток хлороформом и получать сыворотки более высокого качества.

Так, в 1965 г. Ю. А. Хавкин предложил модификацию метода Хансена, послужившую основой для дальнейших разработок Уфимского научно-исследовательского института вакцин и сывороток. Метод был назван РПГ (риванол—пепсин—гидроокись алюминия). Он включает стадии предварительной очистки плазмы от балластных белков с помощью риванола, удаления риванола активированным углем, протеолиза сывороточных белков пепсином, обработки ферментированного материала гелем гидроокиси алюминия и высаливания антитоксических глобулинов позволяет снизить потери антитоксина, однако из-за сложности и трудоемкости он не вошел в производственную практику. Предложенный Ю.

А. Хавкиным и Т. А. Баталовой (1971) бессолевым методом очистки и концентрирования, который предусматривает применение сорбентов и ультрафильтрации, также по ряду причин не может быть внедрен в производство.

Ташкентским и Московским институтами вакцин и сывороток предложены сорбционные методы очистки и концентрирования, позволяющие заменить стадии термоденатурации и обработки сывороток хлороформом сорбционными процессами. Эти методы апробированы в производственных условиях. Они позволяют значительно улучшить качество очищенных сывороток при одновременном снижении потерь антитоксина. Однако и они требуют специального аппаратного оформления, поэтому в производственную практику внедрены лишь некоторые их модификации. Наиболее перспективными для значительного увеличения степени очистки сывороток при одновременном снижении потерь антитоксина в процессе очистки оказались методы, включающие удаление из плазмы перед протеолизом части балластных веществ и применение сорбентов в наиболее активной их форме — в момент их формирования из солей непосредственно в белковом растворе.

Таким образом, вопросы повышения качества очищенных антитоксических сывороток не получили полного разрешения и требуют дальнейшего изучения. Наряду с созданием более совершенных схем и условий гипериммунизации лошадей, улучшением качества антигенов и адъювантов, применяемых для их грундрования и гипериммунизации, следует считать главным направлением работы создание высокоочищенных сывороток со сниженной реактогенностью. На данном этапе важными задачами являются организация производства очищенных препаратов пепсина, применяемого для ферментативного гидролиза сывороточных белков в процессе очистки сывороток, и переход всех сывороточных производств на применение только высокоочищенного фермента. Это позволит исключить влияние примесей других протеолитических ферментов

на протекание процесса протеолиза антитоксина и других сывороточных белков и на свойства очищенных и концентрированных сывороток, а также снизить содержание в них нежелательных примесей веществ, по специфичности идентичных групповым антигенам крови человека, и значительно уменьшить потери антитоксина в процессе очистки. Применение очищенного фермента в технологии изготовления антитоксических лошадиных сывороток будет способствовать значительному снижению их реактогенности и вследствие этого уменьшению вызываемых ими осложнений и побочных реакций.

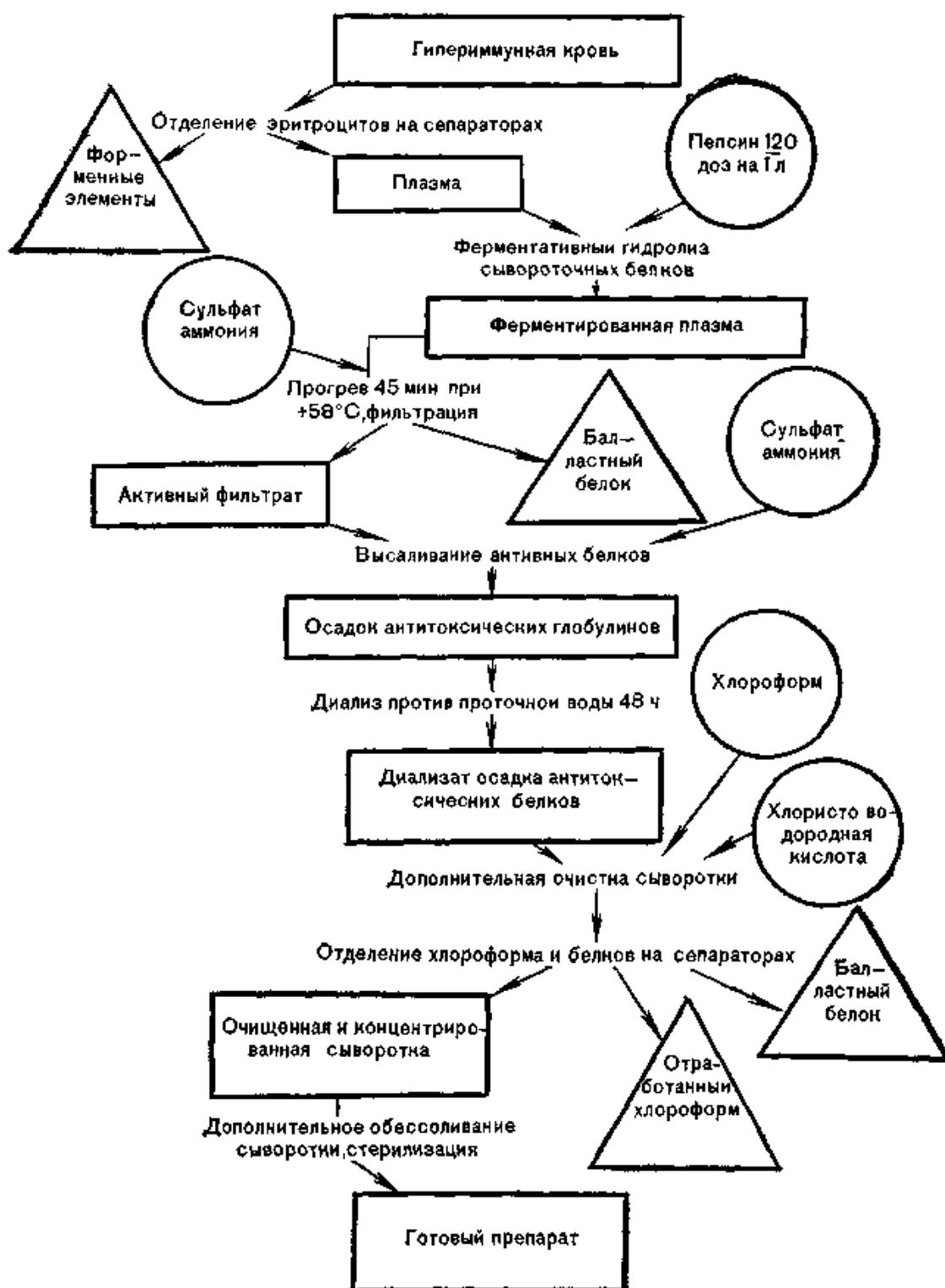


Схема 2. Очистка и концентрация антитоксической лошадиной плазмы по методу Диаферм-3.

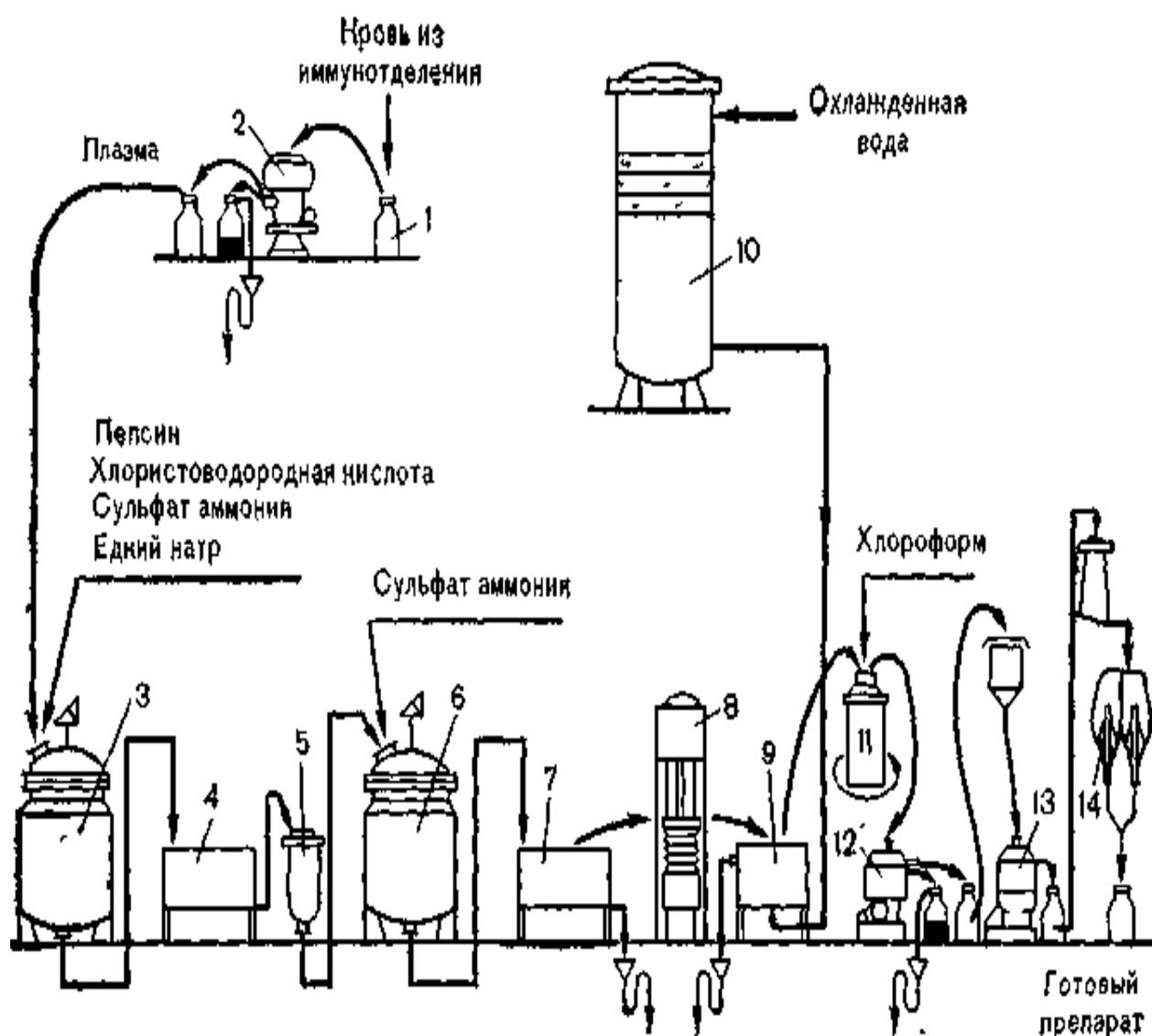


Рис. 20. Схема производственного процесса очистки и концентрации лошадиной антитоксической плазмы методом Диаформ-3.

1 — иммунная (цитратная) кровь из иммуноделения, 2 — отделение форменных элементов на сепараторах АС-2Ж; 3 — реактор для проведения процессов ферментативного гидролиза и термоденатурации сывороточных белков, 4 — кассетный фильтр, 5 — мерник, 6 — реактор для высаливания антитоксических глобулинов, 7 — кассетный фильтр, 8 — гидравлический пресс, 9 — диализная ванна с проточной водой, 10 — осветляющий фильтр для воды, 11 — эмульгирование хлороформа и дополнительная очистка сыворотки от балластных белков, 12 — отделение хлороформа на сепараторах АС-4Е, 13 — осветление сыворотки на сепараторах АСТ-3М, 14 — стерилизующая фильтрация на фильтрах Сальникова

Лекция №8

Тема: Основные методы контроля вакцинных препаратов

Методы контроля препаратов. Технологические схемы производства вакцин предусматривают контроль ряда показателей, характеризующих питательные среды, маточные культуры, полуфабрикаты на последовательных этапах производства вакцин, вакцины до розлива и готовые лекарственные формы. Большая часть определений ставится непосредственно производственным отделением либо производственным отделением совместно с отделом биологического контроля (ОБК) предприятия, некоторые проводятся только ОБК. Готовые препараты выборочно контролируют в ГИСК им. Л. А. Тарасовича. Контроль осуществляют в строгом соответствии с утвержденной технологической документацией.

Этапы контроля корпускулярных вакцин.

Контроль вакцин осуществляют на всех этапах их производства.

В процессе изготовления контролируют полуфабрикаты: 1) нативную взвесь — стерильность, густота микробной взвеси, микроскопия мазков, иммуногенность; 2) разведенную вакцину — стерильность, густота микробной взвеси, микроскопия мазков; 3) сухую массу антигена до разведения — микроскопия мазков, серологическая активность. При контроле готовых препаратов оценивают: 1) сухую вакцину — физические свойства, растворимость и гомогенность при добавлении растворителя, наличие вакуума, влажность, содержание фенола или других веществ, стерильность, микроскопия мазков, безвредность, иммуногенность, переносимость, правильность фасовки, этикетировки, упаковки; 2) растворитель вакцины (изотонический раствор хлорида натрия) — стерильность, безвредность; 3) раствор антигена — физические свойства, микроскопия, стерильность, серологическая активность, безвредность, иммуногенность, переносимость и правильность фасовки, этикетировки и

упаковки; 4) сухую вакцину, обогащенную антигеном, — безвредность, иммуногенность, переносимость.

Этапы контроля химических вакцин.

Контроль питательной среды (до стерилизации) — микроскопия мазка, рН, физические свойства.

Контроль маточной (посевной) культуры — микроскопия мазка, серологические свойства, густота микробной взвеси.

Контроль производственной (реакторной) культуры — микроскопия мазка, серологические свойства, густота микробной взвеси, рН.

Контроль жидких сорбированных антигенов - микроскопия мазка, определение содержания золы, иммуногенности, общего белка, антигенную активность (РДП, ИФА и др.), количество сорбента (окиси алюминия).

Контроль сухих антигенов — микроскопия мазка, определение содержания золы, влажности, иммуногенности.

Контроль полуфабрикатов вакцины до розлива — стерильность, полнота сорбции антигенов, физические свойства, рН, микроскопия мазка (бактериологическая чистота), безвредность на белых мышах, безвредность на морских свинках, иммуногенность, содержание Al_2O_3 .

Контроль вакцины после розлива — физические свойства, рН, стерильность, бактериоскопическая чистота, правильность этикетировки, переносимость для людей.

Описание методов контроля. Микроскопия мазка. Мазки обычно красятся по Граму. При контроле среды не допускается наличия посторонней макрофлоры (ПМФ). Другая микрофлора у кишечных вакцин допускается в количестве не более 30 клеток в 40 полях зрения. При контроле посевного материала и культур в процессе глубинного выращивания в мазках не должно быть посторонней микрофлоры; допускается умеренный полиморфизм клеток возбудителей.

В мазке взвеси сухих антигенов (10 мг/мл) ПМФ не допускается, у кишечных вакцин допускается наличие убитой посторонней микрофлоры в

количестве не более 20 клеток в 40 полях зрения.

Определение рН производится колориметрически по Михаэлису или потенциометрически со стеклянным электродом, в процессе глубинного культивирования автоматически с помощью системы датчиков.

Серологические свойства определяются по реакции агглютинации на стекле с помощью типовых сывороток или РДП на ППС в чашках Анубра. При контроле препаратов Vi-антигена кишечных вакцин проводят определение в реакции коль-цепреципитации и пассивной гемагглютинации в сравнении с референс-антигеном

Густота микробной взвеси определяется нефелометрически или визуально с помощью оптических стандартов ГИСК им. А. А. Тарасевича.

Определение содержания золы в антигенах. Проводят весовым методом по сухому остатку, полученному после прокаливания навески антигена в муфеле (навеску сжигают при температуре 200—300°C и прокаливают при 600°C до постоянной массы).

Определение остаточной влажности антигенов проводят весовым методом (100 мг антигена высушивают в тарированном бюксе в термостате при 100°C в течение 1 ч при атмосферном давлении). Остаточная влажность антигенов не должна превышать 5...10%.

Определение иммуногенности сухих антигенов и антигенных компонентов вакцин. Например, испытание иммуногенности брюшнотифозных и В-паратифозных антигенов проводят параллельно с испытанием соответствующих референс-препаратов ГИСК им. А. А. Тарасевича в одном опыте на мышах смешанного поголовья массой 14—16 г. Вакцинация однократная, подкожная, в объеме 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Используют 4 группы по 10 мышей, вводя им десятикратно уменьшающиеся дозы. Антигены испытывают в сорбированной форме; 1 мл сорбированного препарата должен содержать 2 мг Al_2O_3 . Заражение производят через 10 сут после вакцинации внутрибрюшинно 16—18-часовой культурой, выращенной на агаре и разведенной в 0,5 мл

изотонического раствора хлорида натрия. Используют вирулентный штамм Ту24446 в дозе заражения 3—6 LD₅₀. В день опыта одновременно ставят контроль культуры на нормальных неиммунизированных мышах из той же партии, заражая их кратными дозами культуры (10 мышей на дозу). Учет гибели мышей в опытной и контрольной группах проводят в течение 3 сут. Наибольшая доза антигена должна предохранять от гибели всех или почти всех мышей, при наименьшей дозе должны погибнуть все или почти все животные. Расчет величины LD₅₀ заражающей культуры и ED₅₀ антигенов и референс-вакцины проводят по методу Кербера в модификации Ашмарина (И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев, 1962).

Иммуногенность антигенов оценивают по величине ED₅₀ в сравнении с величиной ED₅₀ референс-вакцины. Например, ED₅₀ брюшнотифозного антигена не должно превышать ED₅₀ референс-вакцины или различия между ними не должны быть статистически существенными.

Иммуногенность может быть оценена и по индексу иммунитета. Это отношение LD₅₀ иммунизированных животных к LD₅₀ неиммунизированных животных. ИИ может достигать от 10 000 до 1 млн относительных единиц.

Контроль иммуногенности химических вакцин. Разведения вакцины для проверки иммуногенности каждого компонента готовят без учета наличия в ней других компонентов.

Например, испытание иммуногенности столбнячного компонента проводят на 20 мышах массой 15—17 г, иммунизируя их 0,2 мл вакцины. Через 21 сут животным вводят 50 D_{1m} столбнячного токсина подкожно. Наблюдение продолжают 6 сут. Вакцина должна обеспечить выживаемость без явлений столбняка не менее чем у 50% мышей при гибели всех контрольных мышей от 1 D_{1m} токсина.

Контроль иммуногенности всех компонентов вакцины проводят совместно с ОБК. Принципы контроля иммуногенности исходных нативных взвесей и готовой корпускулярной вакцины не отличаются от описанных выше.

Контроль стерильности. Контроль стерильности проводят на всех этапах изготовления кишечных вакцин в соответствии с приведенными выше схемами контроля.

Для обеспечения гарантии выявления даже ничтожного бактериального загрязнения препарата большое значение имеет выбор наиболее чувствительных питательных сред. Поскольку нет универсальной питательной среды, обычно применяют набор питательных сред. В последние годы в РФ по рекомендации ВОЗ используют тиогликолевую питательную среду, которая обладает способностью выявлять как аэробных, так и анаэробных микробов разных видов, а также нейтрализовать добавляемые к препаратам консерванты. В дополнение к тиогликолевой среде применяют питательный бульон и питательный агар с 0,5% глюкозы, жидкую среду Сабуро для выявления роста грибов.

Результаты учитывают путем визуального, а в случае проростов — и микроскопического исследования всех посевов через 10 сут после первичного посева образцов на тиогликолевую среду. В случае пророста хотя бы одной пробирки контроль стерильности повторяют на удвоенном наборе питательных сред. При наличии в повторном контроле проростов материал бракуют как нестерильный.

Контроль полноты сорбции антигенов проводят в полуфабрикатах вакцины и в готовой вакцине. Ставят реакцию преципитации надосадочной жидкости при разведении изотоническим раствором хлорида натрия. В ряде случаев допускается положительная реакция в разведении надосадочной жидкости полуфабриката не более чем 1 : 8, а готовой вакцины — не более чем

1 : 4.

Контроль физических свойств и pH вакцины. Физические свойства вакцины определяют визуально. Она должна иметь вид бесцветной жидкости в которой взвешен стерильный осадок гидроокиси алюминия с сорбированными антигенами, легко разбивающийся при встряхивании и

образующий гомогенную взвесь. Определение рН производят потенциометрически с помощью стеклянного электрода.

Сухие корпускулярные вакцины должны иметь вид белого гигроскопического порошка, растворители вакцин (изотонический раствор хлорида натрия и раствор антигена) — бесцветной жидкости. При введении растворителей сухие вакцины должны в течение 1 мин переходить в состояние гомогенной взвеси светло-серого цвета.

Определение степени вакуума. Сухие вакцины выпускают в ампулах, запаянных под вакуумом. Проверку степени вакуума в запаянных ампулах с вакциной производят аппаратом д'Арсонваля или трансформатором Тесла.

Контроль безвредности. Безвредность вакцинных препаратов может быть выявлена биологической пробой на животных. Препараты вводят подкожно белым мышам, морским свинкам, кроликам или другим лабораторным животным. Перед опытом животные находятся под наблюдением 3 сут, в опыт берут только здоровых.

Контроль содержания в вакцине Al_2O_3 определяют методом титрования сульфатом цинка. Для определения Al_2O_3 содержания вакцину тщательно перемешивают и берут пробы в объеме 15—20 мл. Содержание Al_2O_3 должно составлять 1,5—2 мг/мл (прививочная доза).

Определение фенола производят методом бромирования с последующим йодометрическим определением избытка брома (М. Ю. Лурье, 1971).

Определение мертиолата. Метод основан на выделении ртути из мертиолата в виде свободных ионов и последующем колориметрическом определении дитиозоната ртути (В. Ф. Рунова, 1972).

Контроль этикетировки и соответствие количества вакцины во флаконе указанного на этикетке проводят выборочно. Дозу розлива выверяют 10-миллиметровым шприцем, этикетировку — по тексту клише.

Переносимость вакцины для людей определяется для некоторых препаратов (кишечные вакцины). Испытание каждой серии вакцины

проводят на группе в 5 человек, которым подкожно в подлопаточную область вводят 1 мл вакцины. Вакцину испытывают на добровольцах — женщинах от 16 до 50 лет и мужчинах до 55 лет. Повторное испытание вакцины на одних и тех же добровольцах можно проводить не более 2 раз с интервалом не менее 6—12 мес.

Непосредственно перед прививкой проводят термометрию прививаемых. Учитывают непосредственную реакцию на прививку, а через 24 ч — температуру, общее состояние и местную реакцию. Повышение температуры до 37,5°C включительно рассматривают как слабую реакцию, от 37,6 до 38,5°C включительно — как среднюю реакцию и от 38,6°C и выше — как сильную. Гиперемию без инфильтрата и инфильтрат на месте прививки до 2,5 см включительно считают слабой местной реакцией, инфильтрат диаметром 2,6—5 см включительно — средней реакцией и инфильтрат более 5 см или наличие лимфангоитов и лимфаденитов — сильной реакцией. Наличие лимфангоита при величине инфильтрата менее 5 см следует расценивать как среднюю реакцию при условии его исчезновения в течение 48 ч после прививки.

Вакцина может быть выпущена для применения при отсутствии сильных (общих и местных) реакций в группе привитых из 5 человек. Допускаются реакции общие и местные средней тяжести не более чем у одного привитого. При наличии общей или местной реакции средней тяжести в 2 случаях или сильной реакции в одном случае в группе из 5 человек вакцину испытывают повторно на группе из 10 человек. Если в последней группе регистрируются средние общие или местные реакции более чем у 2 человек или сильная реакция у одного, вакцина не может быть выпущена для массового употребления.

Результаты испытания переносимости вакцины протоколируют в производственном отделе и в ОБК.

Лекция №9

Тема лекции: Принципы контроля бактериальных и вирусных препаратов

Постоянное совершенствование средств специфической профилактики является неперенным условием успешной борьбы с инфекционными заболеваниями.

Противоэпидемическая служба нашей страны имеет в своем распоряжении свыше 500 вирусных и бактериальных профилактических и диагностических препаратов, качество которых постоянно улучшается за счет внедрения новейших достижений современной науки и совершенствования технологии их производства. Однако, несмотря на столь обширный арсенал биологических препаратов, задача ликвидации инфекционной заболеваемости остается одной из актуальных проблем отечественного здравоохранения.

Основополагающий принцип государственного надзора и контроля за качеством медицинских биологических препаратов в РФ заключается в комплексе мероприятий, обеспечивающих поступление в практику здравоохранения полностью безопасных стандартных и эффективных средств специфической профилактики, лечения и диагностики инфекционных болезней.

Одним из наиболее важных звеньев в комплексе этих мероприятий является система апробации и внедрения вновь разработанных или модифицируемых бактериальных, риккетсиозных, вирусных и сывороточных профилактических и диагностических препаратов, а также аллергенов для диагностики инфекционных болезней. Значимость надежной и оперативной системы отбора наиболее эффективных и, естественно, полностью безвредных препаратов становится особенно очевидной, если учесть, что успехи, достигнутые в снижении и ликвидации заболеваемости отдельными инфекциями, являются следствием широкой, массовой иммунизации больших контингентов населения.

В связи с изложенным еще приказом министра здравоохранения от 27 августа 1971 г. была предусмотрена система апробации и внедрения в практику этой категории препаратов, обеспечившая проведение их лабораторного испытания и оценку в условиях эпидемического опыта в рамках одного четко спланированного исследования.

Принципиальная схема этой системы заключается в том, что после всестороннего экспериментального изучения нового препарата осуществляется первый этап его испытания на ограниченном контингенте добровольцев. Директорам институтов, разработавших препарат, предоставлено право по рекомендации Ученого совета института разрешать испытания препарата на 20 взрослых добровольцах для первичной оценки его безвредности, реактогенности и иммуногенности.

Следующий этап — испытание нового препарата в ограниченном опыте, с теми же целями, но на большем числе лиц, совместно с Государственным научно-исследовательским институтом по биологической стандартизации и контролю (ГИСК) имени Л. А. Тарасевича и с разрешения Комитета вакцин и сывороток Министерства здравоохранения РФ. По результатам проведенного ограниченного опыта институт-автор совместно с ГИСК имени Л. А. Тарасевича дают свои рекомендации

для государственного испытания препарата. Государственное испытание проводится с целью определения безвредности, реактогенности, иммуногенности, профилактической и эпидемиологической эффективности, а также выбора наиболее объективных методов стандартизации и лабораторного контроля. Разрешение на проведение государственных испытаний дает Министерство здравоохранения РФ по рекомендации Комитета вакцин и сывороток, которому институт-автор и ГИСК имени Л. А. Тарасевича представляют отчет о результатах ограниченного опыта, заключение о сериях препарата и «плацебо», которые будут использованы в государственном испытании. Последним этапом является изучение эффективности массового применения препарата с целью определения его

места в календаре профилактических прививок и оптимальной схемы иммунизации на основе установления длительности и напряженности поствакцинального иммунитета.

Таким образом, любой новый бактериальный или вирусный препарат, предназначенный для введения людям, предварительно тщательно изучается в лабораторных испытаниях и в опытах на животных. Это относится и к каждой серии принятых в практику препаратов. Производство и контроль бактериальных и вирусных препаратов регламентируются специальными требованиями. Критерии и параметры, которым должен соответствовать каждый профилактический препарат, изложены в Международных требованиях на каждый препарат, составляемых специальными группами экспертов Всемирной организации здравоохранения. На основании этих требований в каждой стране составляются Национальные требования, утверждаемые соответствующими контрольными учреждениями Министерства здравоохранения.

В РФ такими требованиями являются технические условия (ТУ) производства препаратов. Технические условия, которые по существу являются отраслевыми стандартами (ОСТ), составляются производственными учреждениями. Затем они согласуются с Комитетом вакцин и сывороток при Министерстве здравоохранения РФ и с ГИСК имени Л. А. Тарасевича. После этого ТУ утверждаются Министерством здравоохранения РФ.

В технических условиях перечислены и описаны все те критерии и параметры, которые определяют стандартность и качество профилактического препарата. Стандартность и качество профилактического препарата обеспечиваются следующими основными условиями:

- 1) изготовлением препарата из хорошо изученного генетически стабильного, иммуногенного штамма микроорганизма;
- 2) изготовлением препарата в приемлемых производственных субстратах;

3) строгим соблюдением правил производства препарата в специальных лабораторных помещениях;

4) строгим контролем препарата на бактериологическую стерильность;

5) использованием на производстве препарата стандартного исходного сырья и реактивов;

6) проведением высококвалифицированными специалистами эпидемиологических исследований на людях, подтверждающих полную безвредность и эффективность препарата.

Обязательным условием производства и контроля бактериальных и вирусных препаратов является использование Международных стандартов или разработанных и утвержденных ГИСК имени Л. А. Тарасовича национальных стандартов для количественной характеристики активности препаратов. В связи с тем, что состав бактериальных и вирусных препаратов биологически сложен, для определения их специфической активности не могут быть применены физико-химические методы в отличие от определения активности фармакологических препаратов. При контроле активности бактериальных и вирусных препаратов применяют только биологические методы сравнения со стандартными препаратами. В зависимости от вида препарата (бактериальный или вирусный, живой или инактивированный) и способов его производства эти методы могут иметь определенные различия, которые принимаются во внимание при составлении технических условий на каждый препарат и которые, как указывалось выше, являются отраслевыми стандартами, учитывающими специфику производства каждого отдельно взятого препарата.

В связи с разнообразием характеристик биологических препаратов неодинаковы и методы их испытания. Общим обязательным требованием является определение безвредности и специфической активности препаратов. Все вводимые парентерально препараты должны быть свободны от микробной или вирусной контаминации. Инактивированные вакцины,

анатоксины и сывороточные препараты должны быть стерильными. Исключение допускается лишь для оспенной вакцины, в которой могут присутствовать в ограниченном количестве непатогенные микробы-загрязнители.

Один из важнейших этапов проверки качества препаратов — испытание на лабораторных животных для определения их безвредности. В этом случае первостепенное значение имеет правильный выбор подопытного животного. Избираемый вид должен обладать достаточно высокой чувствительностью. Оценку безвредности препарата производят на основании данных о гибели или выживании животных, клинических проявлений инфекции или интоксикации, бактериологических показателей, изменений массы тела животных. В ряде случаев обязательно изучение патоморфологических изменений у привитых животных, забиваемых в разные сроки после прививки.

Для выявления неспецифической токсичности препаратов, связанной с наличием в них стабилизаторов, сорбентов, консервантов и других компонентов, применяются соответствующие химические методы исследования.

Следующим важным этапом проверки качества биологического препарата является определение его реактогенности на ограниченной группе людей-добровольцев, так как самая углубленная проверка на животных не дает полного представления о возможном характере реакции организма человека. Это испытание проводится под строгим медицинским наблюдением.

О реактогенности судят по температурной реакции организма, воспалительной реакции на месте аппликации препарата, а также другим объективным субъективным явлениям. В некоторых случаях прививаемых целесообразно подвергать более углубленному клиническому и лабораторному обследованию, включающему анализ крови, мочи, измерение кровяного давления, электрокардиографическое и

электроэнцефалографическое исследование, определение содержания С-реактивного белка и т. д. Такие наблюдения следует осуществлять в динамике с учетом статуса до вакцинации.

Наиболее сложна и ответственна проверка специфической активности бактериальных и вирусных препаратов. В ряде случаев об иммунологической эффективности препаратов можно судить по показателям, выявляемым при лабораторных тестах. К ним относятся определение содержания антител в сыворотках и глобулинах, концентрация антигенов в вакцинах и анатоксинах. Косвенными показателями иммунологической активности могут служить титр вируса на культуре клеток и определение титра антител при введении вакцин животным. При определении иммуногенности живых вирусных вакцин в ограниченных исследованиях на людях большое значение имеет характер ответных реакций. Например, повышенная реактивность может быть вызвана нарушением технологии производства или сменой вакцинного штамма (корь, оспа), отсутствие реакции — утратой способности вакцинного вируса приживаться в организме. Следует также иметь в виду, что выраженность активной защиты, создаваемой у вакцинированного организма, связана в первую очередь с характером инфекции и поствакцинальным иммунитетом у переболевших. Корь, оспа, туляремия, после которых создается практически пожизненный иммунитет, позволяют получать достаточно напряженный иммунитет и при вакцинации. При инфекционных болезнях, не сопровождающихся длительным иммунитетом (грипп, дизентерия, бруцеллез и др.), нельзя рассчитывать на создание напряженного поствакцинального иммунитета.

В ряде случаев из-за отсутствия подходящих экспериментальных животных для оценки иммуногенности вакцин против ряда антропонозов прибегают к необычным способам инфицирования лабораторных животных (например, внутримозговому заражению возбудителем коклюша, внутрибрюшинному введению сальмонелл) или к стимулированию инфекционного процесса введением агара, муцина и т. п. Наиболее

объективными следует признать тесты, позволяющие определять специфическую активность препарата в интернациональных защитных единицах с использованием национального стандарта, подтитрованного к международному. Совершенно очевидно, что наиболее достоверно оценить лабораторный метод определения специфической активности биологических препаратов можно лишь при сопоставлении полученных данных с результатами строго контролируемых эпидемиологических наблюдений.

Таковы в общих чертах основные принципы лабораторной оценки и контроля бактериальных и вирусных препаратов.

Лекция № 10

Тема лекции: Анатоксины технология получения

Анатоксины (*anatoxina*; греч. *ana-* - против + токсины) -бактериальные токсины, потерявшие в результате специальной обработки свои токсические, но сохранившие антигенные и иммуногенные свойства. Обычно токсины обезвреживают воздействием формалина и тепла (35-38°). Возбудители токсинемических инфекций - дифтерии, столбняка, газовой гангрены, ботулизма и др. - вырабатывают очень сильные экзотоксины, обладающие антигенными свойствами.

В 1909 г. Левенштейн случайно обнаружил быстрое \ падение токсичности столбнячного токсина под влиянием ультрафиолетовых лучей и формалина. В дальнейшем Эйслер (1912) и Левенштейн установили, что после добавления к столбнячному токсину 0,1 - 0,3% формалина и выдерживания при повышенной температуре происходит обезвреживание токсина. В ведение такого токсина вызывает иммунитет у животных.

Десять лет спустя метод приготовления анатоксина., пригодного для иммунизации людей, был разработан, Гастоном Рамоном о чем он сообщил 10 декабря 1923 г. во французскую Академию наук. Рамон установил, что при воздействии формалина и тепла на дифтерийный токсин образуется обезвреженное соединение, обладающее антигенными и иммуногенными свойствами. Изучая реакцию флоккуляции дифтерийного токсина с антитоксином, он применял формалин как антисептик для сохранения токсина. Добавление формалина к токсину не препятствовало появлению феномена флоккуляции, даже если этот токсин подвергался действию умеренного тепла в термостате. Не влияя на способность токсина флоккулировать, формалин резко снижал его токсические свойства, как и ряд других хим. и физ. свойств. Реакция флоккуляции токсинов с антитоксинами сыграла большую роль в разработке метода приготовления анатоксина. С помощью этой реакции можно было легко контролировать изменение антигенных свойств анатоксина в процессе обезвреживания токсинов формалином. До применения этой реакции было невозможно установить,

сохраняет ли токсин антигенные свойства при потере токсигенных свойств. Некоторые анатоксины могут быть аллергенами и вызывать у особо чувствительных субъектов общие и местные реакции, не имеющие отношения к специфической токсичности. Анатоксины обладают свойственной стабильностью и необратимостью: при длительном хранении при разных температурах они сохраняют свою безвредность и антигенные свойства. Антигенные свойства анатоксинов определяют по реакции связывания анитоксинов, которая выражается в единицах связывания (ЕС), или по реакции флоккуляции с анитоксинами. Иммуногенные свойства анатоксинов определяют путем иммунизации животных (морские свинки, мыши) и выражают в иммунизирующих единицах (ИЕ), т. е. в способности определенного количества анатоксина защищать животных от введения соответствующих токсинов.

Принципы изготовления анатоксинов, разработанные Рамоном легли в основу производства анатоксинов во многих странах мира. Это позволило начать массовую иммунизацию против дифтерии и столбняка, которая привела к резкому снижению заболеваемости этими инфекциями. Процесс формалиновой детоксикации рассматривают как необратимое нарушение структуры активного центра токсина за счет реакции с формалином входящих в состав токсина функциональных групп. На первых этапах детоксикация протекает очень быстро (как правило, на 1-4-е сутки инкубирования с формалином наблюдается падение токсичности на 80-90 процентов), а достижение полной безвредности происходит только через 2-4 недели и более. Для получения безвредных и стабильных анатоксинов после обезвреживания должно пройти некоторое время для «созревания» анатоксина. Обезвреживание бактериальных токсинов без нарушения их антигенных свойств происходит в нейтральной среде. Кислая среда препятствует взаимодействию формалина с аминоклуппами токсина,

замедляет или совсем прекращает процесс обезвреживания. Если формализация токсинов идет в щелочной среде, то обезвреживание токсина происходит быстро, но со значительной потерей его антигенных свойств. Оптимальное количество формалина для детоксикации всех токсинов рекомендуется

от 0,3 до 0,8 процентов; в пределах этого количества к некоторым токсинам нужно добавлять формалин дробным методом, это способствует более быстрому обезвреживанию токсина без сильной потери антигенных свойств. Для обезвреживания токсина имеет большое значение температура, при которой содержится токсин. Повышение температуры ведет к более быстрой детоксикации всех токсинов со значительной потерей антигенных свойств. Попытки разработать ускоренный метод обезвреживания бактериальных токсинов путем добавления 1 - процентного и более формалина при $1^{\circ} 36 - 40^{\circ}$ приводили к потере токсичности через 6-8 суток инкубации с резким снижением антигенных свойств. Увеличение количества формалина при детоксикации не оправдано еще и потому, что независимо от количества взятого формалина лишь определенная часть его вступает во взаимодействие с токсином. Количество связанного формалина зависит от состава среды, на которой приготовлен токсин, от содержания аминного азота, от химического состава токсина.

Для очистки анатоксина от балластных белков применялось фракционное осаждение различными концентрациями сульфата аммония. В настоящее время этот метод используется лишь на отдельных этапах очистки

и концентрации небольших объемов анатоксина.

В зарубежных странах для очистки и концентрации дифтерийного и столбнячного анатоксина применяют метод ультрафильтрации через почкообразные фильтры, покрытые 8 процентной парлодиновой оболочкой. Осадок после растворения в воде фракционируют сульфатом аммония при различных процентах насыщения. Очищенный дифтерийный анатоксин содержит 1800 - 2500 Li на 1 мг общего азота (Li - сокр. англ. limit of flocculation - порог флоккуляпни).

В СССР для очистки и концентрации анатоксинов ботулинических, возбудителей газовой гангрены, дифтерийного и столбнячного анатоксина применяют кислотное осаждение. Перед подкислением для усиления ионной силы раствора в анатоксине растворяют 10-30 процентов хлорида натрия. Затем понижают рН анатоксинов до 3,5, добавляя HCl; выпавший осадок отделяют от жидкости и растворяют в 1/20 части изотонического раствора хлорида натрия от

объема исходного анатоксина. Полученный концентрат анатоксина подвергают дальнейшей очистке повторным осаждением ацетоном. При кислотном осаждении столбнячного и других анатоксинов в некоторых лабораториях для усиления ионной силы раствора анатоксина применяют гексаметофосфат. Бактериальные токсины и анатоксины можно очистить с помощью сорбции фосфатом алюминия, гидратом окиси алюминия, фосфатом кальция и другими неорганическими сорбентами с последующей элюцией; кроме того, все более широкое применение находят методы ионообменной хроматографии и гель-фильтрации через сефадексы различных марок.

Для иммунизации против токсинемических инфекций применяются анатоксины, депонированные на гидрате окиси алюминия и фосфате алюминия; алюминиево-калиевые квасцы для депонирования применяются только в ветеринарной практике. Высокую иммуногенность депонированных анатоксинов объясняют адьювантным действием сорбента и замедленной резорбцией из депо антигена. В результате этого происходит длительное поступление небольших количеств анатоксина в организм, что ведет к развитию напряженного иммунитета. Применение дифтерийного и столбнячного анатоксинов, сорбированных на гидроокиси алюминия, для массовой иммунизации людей в СССР дало резкое снижение заболеваемости дифтерией и столбняком.

Иммунизацию детей против дифтерии, столбняка и коклюша проводят ассоциированной вакциной, включающей сорбированные дифтерийный, столбнячный анатоксин и корпускулярную коклюшную вакцину.

В 1959 г. был предложен концентрированный адсорбированный анаэробный полианатоксин, включающий столбнячный анатоксин, несколько типов гангренозного и ботулинического анатоксина (всего 7 антигенов), обладающий хорошими иммуногенными свойствами.

Анатоксины выпускают в виде монопрепаратов (дифтерийный, столбнячный, стафилококковый и др.) и ассоциированных препаратов (дифтерийно-столбнячный, ботулинический трианатоксин). В последние

годы разработан препарат коклюшного анатоксина, который в ряде зарубежных стран вошел в число компонентов бесклеточной коклюшной вакцины. В России используется иммуноглобулин человека нормальный с повышенным содержанием коклюшного анатоксина, предназначенного для лечения тяжелых форм коклюша. Для достижения напряженного антитоксического иммунитета препараты анатоксинов требуют, как правило, двукратного введения с последующей ревакцинацией. При этом их профилактическая эффективность достигает 95-100 процентов и сохраняется в течение нескольких лет. Важной особенностью анатоксинов является также и то, что они обеспечивают сохранение в организме привитого стойкой иммунологической памяти. Поэтому при повторном их введении людям, полноценно привитым 10 и более лет назад, происходит быстрое образование антител в высоких титрах. Именно это свойство препаратов обуславливает оправданность их применения при постэкспозиционной профилактике дифтерии в очаге, а также столбняка в случае экстренной профилактики. Другой не менее важной чертой анатоксинов является их относительно низкая реактогенность, что позволяет свести в минимум перечень противопоказаний к применению.

Примеры препаратов на основе анатоксинов.

1. Анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный с пониженным содержанием антигена жидкий (АДС-М) ФСП 42-0010-4376-03 регистрационный номер 002668/01-2003

Состав: препарат состоит из смеси очищенных анатоксинов - дифтерийного и столбнячного, адсорбированных на гидроксиде алюминия. В 1 мл содержится 10 флокулирующих единиц (ЛФ) дифтерийного и 10 анитоксин - связывающих единиц (ЕС) столбнячного анатоксинов. Консервант - мертиолят в концентрации 0,01 процент.

Представляет собой суспензию белого или слегка желтоватого цвета, разделяющуюся при стоянии на прозрачную жидкость и рыхлый осадок, легко

разбивающийся при встряхивании.

Свойства: введение препарата в организм человека вызывает образование специфического иммунитета против дифтерии и столбняка.

Назначение: АДС-М анатоксин предназначен для вакцинации детей с 6-летнего возраста, подростков и взрослых, с целью профилактики дифтерии и столбняка.

Применение: препарат вводят внутримышечно, в верхний наружный квадрант ягодицы или подкожно в подлопаточную область в объеме 0,5 мл (разовая доза).

Примечание: лиц, привитых столбнячным анатоксином между ревакцинациями, прививают АД-М анатоксином. Курс вакцинации состоит из 2х прививок с интервалом 30-45 дней. Сокращение интервала не допускается.

Первую ревакцинацию проводят через 6-9 месяцев после законченной вакцинации однократно, вторую ревакцинацию - с интервалом в 5 лет. Последующие ревакцинации осуществляются каждые 10 лет без ограничения возраста. В качестве замены АКДС-вакцины у детей с сильными общими реакциями (температура до 40⁰ и выше) или поствакцинальными осложнениями на указанные препараты.

Противопоказания: отсутствуют, не рекомендуется беременным. **Форма выпуска:** выпускают АДС-М анатоксин в ампулах по 0,5 или 1,0 мл (1 и 2 дозы). В упаковке содержится 10 ампул [12].

2. Анатоксин столбнячный очищенный адсорбированный жидкий (АС-анатоксин)

Действующее вещество:
(столбнячный анатоксин очищенный жидкий)

Форма выпуска, состав и упаковка: Выпускают в ампулах по 0,5, 1 мл, в картонной упаковке 10 ампул.

Регистрационные №№: сусп. д/п/к введения 0.5 мл/1 доза: амп. 0.5 мл или 1 мл - ЛС-000434, 25.12.07. Код АТС. 107AM01

Фармакологическое действие: вызывает формирование специфического

иммунитета против столбняка. В одной прививочной дозе содержится 10 антитоксинвызывающих единиц (ЕС) столбнячного анатоксина, что соответствует не менее 40 МИЕ.

Показания к применению препарата: активная иммунизация против столбняка в соответствии с графиком плановых прививок; экстренная профилактика столбняка.

Режим дозирования: активная иммунизация проводится у лиц, ранее не привитых против столбняка, и состоит из двух прививок с интервалом 30-40 дней и ревакцинацией через 6-12 мес. с использованием каждый раз 1 дозы анатоксина. Последующие ревакцинации - 1 раз в 10 лет однократно. С целью экстренной профилактики анатоксин вводят с противостолбнячной сывороткой. Доза и кратность введения устанавливаются индивидуально, в зависимости от клинической ситуации. Анатоксин вводят п/к в подлопаточную область.

Назначение: препарат предназначен для проведения плановой профилактики коклюша, дифтерии и столбняка у детей в возрасте от 3-х месяцев по особой схеме.

Применение: прививки АКДС-вакциной проводят в возрасте от 3х мес. До достижения возраста 3 года 11 мес.29 дней. (Прививки детям, переболевшим коклюшем, проводят АДС-анатоксином). АКДС-вакцину вводят внутримышечно, в верхний наружный квадрант ягодицы в дозе 0,5 мл (прививочная разовая доза). Курс вакцинации состоит из 3х прививок с интервалом 1.5 месяца (3 месяца, 4,5 месяца, 6 месяцев.) АКДС-вакцину можно вводить одновременно с полиомиелитной вакциной и другими препаратами национального календаря прививок. Ревакцинацию проводят однократно в возрасте 18мес. (при нарушении сроков прививок - через 12-13 месяцев после последней вакцинации АКДС-вакциной).

Противопоказания: прогрессирующие заболевания нервной системы, афебрильные судороги в анамнезе, развитие на предшествующее введение АКДС-вакцины сильной общей реакции(повышение температуры в первые двое суток до 400 и выше) или осложнения.

Форма выпуска: выпускают АКДС в ампулах по 1,0 мл (2 прививочные дозы).

В упаковке содержится 10 ампул [12].

Побочное действие: возможно: слабость, недомогание, головная боль, подъем температуры (указанные симптомы обычно исчезают через 24-48 ч). В очень редких случаях: анафилактический шок. Местные реакции: покраснение, отек, болезненность в месте введения.

Противопоказания к применению препарата: для проведения экстренной профилактики противопоказаний нет. Для проведения плановой вакцинации - острые инфекционные заболевания и хронические заболевания в фазе обострения.

Особые указания: после введения анатоксина необходимо наблюдение за пациентом в течение 30 мин для принятия необходимых срочных мер в случае развития острых побочных реакций [11].

3. Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая (АКДС-вакцина) суспензия для инъекций ФСП 42-0010-4378-03 регистрационный номер 002666/01 -2003

Состав: АКДС-вакцина состоит из взвеси убитых коклюшных микробов и очищенных анатоксинов, столбнячного и дифтерийного, адсорбированных на гидроксиде алюминия. Консервант - мертиолят в концентрации 0,01%. Содержит в 1 мл препарата 20 млрд. коклюшных микробных клеток, 30 флокулирующих единиц (ЛФ) дифтерийного антитоксинсвязывающих единиц (ЕС) столбнячного анатоксина. В одной первичной дозе (0,5 мл) содержится не менее 30 международных иммунизирующих единиц (МИЕ) дифтерийного анатоксина, не менее 60 МИЕ столбнячного анатоксина и не менее 4 международных защитных единиц коклюшной вакцины. Представляет собой суспензию белого или слегка желтоватого цвета, разделяющуюся при стоянии на прозрачную жидкость и рыхлый осадок, легко разбивающийся при встряхивании.

Свойства: введение АКДС-вакцины в организм человека вызывает образование специфического иммунитета против коклюша, дифтерии и столбняка.

Лекция №11

Тема лекции: Лечебно-профилактические бактериофаги

Для лечения и профилактики ряда инфекций в нашей стране наряду с вакцинами, антибиотиками и другими препаратами применяют бактериофаги. Большую группу среди них составляют бактериофаги против кишечных инфекций: дизентерийный, брюшнотифозный, сальмонеллезный групп ABCDE, коли-протейный.

Развитие резистентных форм бактерий и осложнения, связанные с применением антибиотиков и сульфамидных препаратов, привели к широкому спросу на так называемые раневые бактериофаги — стафилококковый, стрептококковый, коли, протейный, синегнойной палочки. Препараты бактериофага выпускают Тбилисский и Уфимский институты вакцин и сывороток, Горьковский и Хабаровский институты эпидемиологии и микробиологии.

Кишечные бактериофаги. Бактериофаг дизентерийный (*Bacteriophagum disentericum*) — препарат, активный в отношении дизентерийных бактерий Флекснера, Зонне и Ньюкасл. Применяют для лечения и профилактики дизентерии.

Бактериофаг брюшнотифозный (*Bacteriophagum salmonellae typhi*) — смесь бактериофагов, активных в отношении возбудителей брюшного тифа различных фаготипов. Препарат применяют для предупреждения заболеваний брюшным тифом в эпидемических очагах.

Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE (*Bacteriophagum Salmonella ABCDE*) — смесь фаголизатов сальмонелл: *S. paratyphi A* и *B*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. cholerae suis*, *S. oranienburg*, *S. newport*, *S. dublin*, *S. anatum*, *S. newlands*. Сальмонеллезный бактериофаг применяют для лечения детей и взрослых, больных сальмонеллезами, санации носителей

сальмонелл, а также с профилактической целью по эпидемическим показаниям на предприятиях мясоперерабатывающей промышленности.

Бактериофаг коли-протейный (*Bacteriophagum coli-prote-um*) — смесь бактериофагов, активных в отношении наиболее распространенных серологических групп энтеропатогенных кишечных палочек: 0111, 055, 044, 020/145, 026, 0124, 0125 и протей (мирабильного и вульгарного). Бактериофаг применяют для лечения детей, больных кишечными заболеваниями, обусловленными энтеропатогенными кишечными палочками, и дис-бактериозов с преобладанием протей.

Кишечные лечебно-профилактические бактериофаги выпускают в жидком виде или в виде кишечнорастворимых таблеток, покрытых кислотоустойчивой оболочкой, и свечей. Для детской практики готовят фаг с пектином.

Раневые бактериофаги. Бактериофаг стафилококковый (*Bacteriophagum staphilococcicum*) — препарат, активный в отношении штаммов стафилококка различного происхождения: выделенных с ожоговой и раневой поверхностей, из крови, желчи, остеомиелитных свищей, из носоглотки больных ангиной и бактериемией. Применяют для лечения и профилактики инфекций, вызванных стафилококком.

Бактериофаг стрептококковый (*Bacteriophagum streptococ-cicum*) — препарат, активный в отношении штаммов стрептококка различного происхождения. Применяют для лечения и профилактики кожных, хирургических стрептококковых инфекций, при ангине, скарлатине и др.

Бактериофаг коли (*Bacteriophagum coli*) — препарат, активный в отношении наиболее распространенных серологических групп энтеропатогенных кишечных палочек. Применяют с лечебной и профилактической целью.

Бактериофаг протейный (*Bacteriophagum protei*) — смесь фаголизатов, активных в отношении наиболее распространенных видов протей

(мирабильного и вульгарного). Применяют с лечебной и профилактической целью.

Бактериофаг пиоцианеус (*Bacteriophageum pyocyaneum*) — препарат, активный в отношении штаммов синегнойной палочки. Применяют для лечения инфекций различных органов и кожных гнойных инфекций, вызванных синегнойной палочкой.

Раневые бактериофаги изготавливают в жидком виде.

Стадии и операции приготовления различных видов бактериофагов имеют много общего. Схемы технологического процесса производства жидких и сухих бактериофагов, представленные на рис. 4 и 5, являются приемлемыми для всех лечебно-профилактических фаговых препаратов. По этим схемам оборудуются и необходимые производственные помещения. Помимо производственных помещений, каждый цех бактериофагов должен иметь лабораторию по сбору и изучению свежевыделенных штаммов бактерий — возбудителей заболеваний соответственно виду препарата.

С точки зрения техники безопасности в производстве бактериофагов требуют внимания следующие этапы: работа с патогенными штаммами бактерий, приготовление маточных фагов, засев реакторов, фильтрация фаголизата, определение литической активности фагов и покрытие таблеток оболочкой из ацетофталата целлюлозы.

Боксы, в которых проводят работу с патогенными культурами, термостат для выращивания микроорганизмов, реакторный бокс должны быть изолированы от других производственных помещений. Кроме того, лаборатория для работы с культурами должна быть строго изолирована от помещений, в которых работают с бактериофагом, во избежание возможности лизогенизации производственных штаммов.

Технология изготовления бактериофагов. Технологический процесс производства жидких бактериофагов состоит из следующих этапов: работы с производственными штаммами бактерий, получения маточных бактериофагов, приготовления серии жидкого бактериофага, контроля

готового препарата на стерильность, безвредность и литическую активность, этикетировки и упаковки препарата.

Подбор штаммов бактерий, необходимых для производства бактериофагов, возлагают на институты, производящие эти препараты. Штаммы выделяют от больных и бактерионосителей. Отобранные для производства штаммы должны находиться в S- и 0-формах (за исключением шигелл Зонне, которые могут быть в O- и RO-формах), обладать типичными морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Производственные штаммы необходимо обновлять за счет свежевыделенных на различных территориях (местах потребления фага данного производства). С целью наилучшего сохранения свойств штаммов целесообразно после проверки высушивать их из замороженного состояния и хранить в темном месте при температуре 2 — 10°C. Расы бактериофагов, применяемые в производстве, выделяют из сточных и речных вод (реже из фекалий больных). Литическую активность выделенных рас проверяют с набором соответствующих культур методом Аппельмана. Наиболее активные расы используют для приготовления маточных фагов.

Серийный бактериофаг готовят в реакторах — специальных аппаратах емкостью от 250 до 500 л. Реакторы имеют паровую рубашку с разрешающим давлением до 3 атм, пропеллерную мешалку, спусковой вентиль и систему труб для аэрации среды. Реактор и все его части изготавливают из нержавеющей стали.

В состав питательных сред для изготовления кишечных и раневых бактериофагов входят белковые основы в виде кислотных или ферментативных гидролизатов казеина, мяса (гидролизат Хоттингера, пептон Мартена). В качестве источника ростовых факторов в производственных питательных средах используют мясные экстракты, чаще с добавлением глюкозы; рН среды в пределах 7,2—7,6 в зависимости от вида бактериофага. В реактор с питательной средой (37°C) засевают нативную взвесь бактерий из расчета 50—150 млн. микробных тел на 1 мл среды (в зависимости от вида

изготавливаемого препарата). Маточный фаг добавляют в количестве 0,01—0,1% объема питательной среды. Содержимое реактора тщательно перемешивают воздухом. Воздух, подаваемый в реактор насосом, поступает через стерильный ватно-масляный фильтр с активированным углем.

Лизис проходит при температуре 37°C. Продолжительность лизиса в реакторе 4—10 ч. По истечении указанного времени определяют (визуально) полноту лизиса и добавляют консервант хинозол в количестве 0,01%. Через 1½—2 ч после добавления консерванта фаголизат фильтруют через стерилизующие пластины и мерно разливают в стерильные флаконы.

Технологический процесс производства сухих бактериофагов включает: работу с производственными штаммами бактерий, получение маточных бактериофагов, приготовление серии жидкого бактериофага, получение серии сухого бактериофага, контроль готового препарата на специфическую стерильность, обсемененность посторонней микрофлорой, безвредность, литическую активность, остаточную влажность, растворимость в искусственном желудочном и кишечном соке, этикетировку и упаковку препарата.

Первые три стадии технологического процесса производства сухих бактериофагов не отличаются от технологии изготовления жидких фагов. Получение серии сухого фага начинается с концентрации жидкого бактериофага путем высаливания сульфатом аммония в количестве 69 % от объема фага. Высаливание продолжается 6—18 ч без последующего диализа при температуре 2—4°C и рН 6,9—7,0. К образовавшейся пастообразной массе добавляют в качестве стабилизатора глюконат кальция (9%). Если защитным покрытием служит пектин, его добавляют одновременно с глюконатом кальция в количестве 3 % от массы. Массу наносят на кассеты (слоем толщиной 1 см) и высушивают из замороженного состояния в вакуум-сушильных аппаратах, обеспечивающих рабочее давление в сублимационной камере до $5 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст. и позволяющих достичь величины остаточной влажности продукта 2—4%. Высушенную массу размельчают с помощью

специального гранулятора и контролируют на специфическую стерильность, обсемененность посторонней микрофлорой и литическую активность. С учетом литической активности различных компонентов составляют смесь для таблетирования поливалентного препарата и определяют массу таблетки (в пределах 0,11—0,25 г).

Таблетуют бактериофаг на таблеточных прессах различных марок с использованием пуансонов, обеспечивающих получение таблеток чечевицеобразной формы, без резких граней. Таблетки без пектина покрывают кислотоустойчивой оболочкой, для чего используют 5 % раствор ацетофталацеллюлозы. Растворителем служит смесь ацетона с этиловым спиртом в соотношении 7 : 3. Для нанесения оболочки таблетки помещают во вращающийся дражировочный котел. Покрытие наносят с помощью пистолета-распылителя. Оболочка из ацетофталацеллюлозы целиком покрывает таблетку бактериофага. Применение пектина в качестве защитного покрытия основано на том, что он создает пленку вокруг каждой корпускулы бактериофага, защищая их от губительного действия желудочного сока даже при нарушении целостности таблетки. При производстве бактериофага используют яблочный пектин, применяемый в пищевой промышленности. Для изготовления свечей тщательно растертый концентрат из порошка бактериофага (0,5 г на одну свечу) смешивают с наполнителем (полиэтиленоксид или гидроноль) до получения однородной массы, из которой отливают суппозитории массой 1,65—1,75 или 1,35—1,45 г (на гидроноле). Готовые таблетки с соблюдением правил стерильности фасуют в стеклянные медицинские банки или пенициллиновые флаконы.

Методы контроля препаратов бактериофага. Бактериофаги контролируют на специфическую стерильность, безвредность, литическую активность. У жидких препаратов определяют также общую стерильность, а у сухих, кроме перечисленных тестов, — обсемененность посторонней микрофлорой, устойчивость к действию желудочного сока, растворимость в кишечном соке и остаточную влажность.

Стерильность жидких фагов (специфическую и общую) устанавливают путем посева препарата (10 флаконов от серии) на тиогликолевую среду. Для контроля специфической стерильности сухих фагов образцы из расчета 15 таблеток из каждых 10000 высевают на 10% желчный бульон с последующим пересевом через 48 ч на среды Плоскирева или Эндо. Степень загрязненности посторонней микрофлорой определяют на чашках с 2% агаром. Среднее число колоний, выросших на всех чашках, не должно превышать 10.

Безвредность проверяют путем подкожного введения 3 мышам массой 14—16 г 1 мл препарата (таблетку предварительно растворяют в 20 мл дистиллированной воды). Бактериофаг не должен вызывать гибели мышей. Срок наблюдения 3 сут.

Литическую активность бактериофага определяют методом Аппельмана. Титрование проводят не менее чем с 2 штаммами каждого вида и серотипа микроорганизмов, в отношении которых препарат должен быть активным. Для каждого вида бактериофага соответствующими ТУ-42 предусмотрены допустимые минимальные титры.

Бактериофаг с оболочкой из ацетофталата целлюлозы испытывают на устойчивость в желудочном соке или 0,1 н. растворе HCl при 37°C и растворимость в кишечном соке или 0,1 н. NaOH. Таблетки должны быть устойчивы к воздействию желудочного сока в течение 3 ч, время растворения в кишечном соке не должно превышать 30 мин.

Остаточную влажность определяют высушиванием до постоянной массы навески размельченных таблеток. В готовом препарате остаточная влажность не должна превышать 7%.

Стандартизацией препаратов бактериофага начали заниматься сравнительно недавно. Впервые референс-препарат был разработан для дизентерийного бактериофага в ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Применение референс-препарата позволило стандартизировать условия оценки его литической активности и улучшить качество препарата. В настоящее время в

ГИСК им. Л. А. Тарасевича проводятся исследования по стандартизации других видов бактериофага и прежде всего по разработке для них референс-препаратов.

Современное производство препаратов бактериофага значительно отличается от прежнего. Оно построено на научной основе, механизировано и частично автоматизировано. Наблюдение за циркулирующей микрофлорой и систематическое введение свежесыведенных штаммов при изготовлении бактериофагов является обязательным требованием технологического процесса. Для повышения активности и расширения литического спектра фагов ведется постоянная работа по селекции высокоактивных рас, адаптации их к антибиотике- и фагорезистентным штаммам бактерий. Теоретические исследования, проводимые в производственных институтах и направленные на изучение концентрации и очистки фагов, фагового носительства у бактерий, их взаимодействия с фагами и других вопросов, способствовали тому, что в настоящее время в нашей стране выпускают препараты фага, обладающие высокой литической активностью и широким диапазоном действия.

Отсутствие противопоказаний к применению и возможность сочетания бактериофагов с другими лекарственными средствами являются большим их преимуществом перед другими препаратами.

Кишечные бактериофаги, выпускаемые в таблетированном виде с ацидорезистентным покрытием из ацетсфталата целлюлозы, пектина, в свечах или жидком виде, служат эффективным средством профилактики и терапии ряда тяжелых инфекций. Особенно перспективны фаги раневой группы. В зависимости от характера очага инфекции эти бактериофаги вводят местно, подкожно, внутрикожно, внутримышечно, в полости, внутрь или в клизмах. Применяют бактериофаги только после определения чувствительности к ним выделенных бактерий.

Бактериофаги против гнойных инфекций особенно широкое распространение в нашей стране получили в период Великой Отечественной

войны как средство для лечения и профилактики инфицированных ран (М. П. Покровская и др., 1941; А. П. Цулукидзе, 1941; Г. А. Кокина, 1941). В дальнейшем фаготерапия была вытеснена применением антибиотиков и сульфаниламидов. Возросшее число заболеваний, вызванных гноеродными бактериями, в особенности стафилококками, широкое распространение сульфаниламидо- и антибиотикоустойчивых форм бактерий, осложнения, связанные с применением этих препаратов, вновь привлекли внимание исследователей к бактериофагам. Появились работы, в которых отмечалась высокая лечебная эффективность бактериофага в терапии различных стафилококковых заболеваний (В. А. Проскуров, 1972; Е. Е. Краснощекова, В. А. Соболева, 1974; В. А. Кучурин, 1974; А. Я. Вартапетов и др., 1974, и др.).

Известен стойкий эффект терапии при острых гнойно-воспалительных процессах. При хронических гнойно-септических заболеваниях лечение бактериофагов давало хорошие результаты только при достижении определенной ремиссии основного процесса, повышении иммунологических особенностей организма (Т. В. Голосова и др., 1972).

Имеются сообщения о том, что в клинике гнойничковых заболеваний кожи и подкожной клетчатки бактериофаг, обеспечивая хороший терапевтический результат, не уступает другим иммунологическим стафилококковым препаратам — анатоксину, антифагину и вакцине.

По данным А. Е. Каплана и соавт. (1974), лечение с применением стафилококкового бактериофага было эффективнее, чем при использовании антибиотиков и антисептиков.

Другими исследователями (Л. К. Вепхадзе и др., 1974; С. Б. Протопопов, 1974; С. Л. Рачкевич, 1974) показана эффективность сочетаний антибиотиков с бактериофагом, дающих «инергидный эффект», а также целесообразность использования бактериофага в сочетании с различными противостафилококковыми препаратами. Необходимо отметить, что наилучшие результаты дает комплексная терапия больных с использованием

местного и внутримышечного способа введения фага (З. Е. Ма-тусис и др., 1974).

Лечение стафилококковой септицемии антибиотиками не всегда эффективно, и, как считают И. Г. Чиракадзе и соавт., (1967), в этих случаях определенное значение приобретает стафилококковый фаг, вводимый внутривенно. Внутривенное введение стафилококкового фага описано И. А. Сутиным (1958). У больных отмечалась бурная, шоковая реакция. Большинство ученых считает эту реакцию ответом на введение продуктов чужеродного белка среды, на которой обычно готовится фаг. Другие исследователи объясняют ее массовым и быстрым разрушением микробов в крови в результате лизиса.

Поскольку одной из причин реактивности лечебного фага может быть состав среды, И. Г. Чиракадзе и соавт. (1967) изучали возможность выращивания стафилофага на синтетической

или полусинтетической среде. Предложена солевая синтетическая среда Келленбергера с добавлением дрожжевого экстракта, обеспечивающего среду необходимыми аминокислотами, факторами роста. Полученный на этой среде фаг характеризовался высоким титром, отсутствием токсигенных свойств, являлся ареактогенным и апирогенным (Т. Г. Чанишвили и др., 1974; Ц. В. Георгадзе и др., 1974). Препарат был использован в эксперименте на животных, а также с хорошим эффектом для лечения больных стафилококковой инфекцией.

Таким образом, стафилококковый бактериофаг, приготовленный на полусинтетической среде с дрожжевым экстрактом, предлагается как препарат, отвечающий требованиям для внутривенного введения. Вместе с тем следует признать перспективными дальнейшие исследования, направленные на получение активного лечебного препарата стаффлофага на безбелковых, безбалластных средах.

Лекция № 12

Тема лекции: Получение антисывороток для диагностических целей

I

ПРИНЦИП МЕТОДА

Для большинства иммунологических и серологических методов исследования необходимо иметь соответствующие антисыворотки. Антисыворотки к так называемым стандартным антигенам имеются в продаже, к нестандартным антигенам антисыворотки приходится получать в лаборатории. Основные требования к таким сывороткам — специфичность и достаточное содержание антител (АТ). Иммунологическая специфичность не абсолютна, она тесно связана со структурой антигена (АГ). Белки ввиду относительного многообразия составляющих их аминокислот и практически неограниченной возможности их комбинирования представляют собой природные соединения с исключительно разнообразным строением. С точки зрения иммунологии это означает, что антитела к определенному белковому антигену могут реагировать только с ним и родственными по структуре белками. Под последними следует понимать гомологичные протеины родственных биологических видов, а также белки, образующие одно «семейство», например гонадотропины. Все они имеют общую α -цепь, в то время как β -цепи содержат полипептидные последовательности, индивидуальные для каждого гормона. Способность к перекрестным реакциям антител с антигенными детерминантами структурно близких белков находит практическое применение. Допустим, требуется получить антитела к какому-либо гормону гипофиза человека; получение антисыворотки невозможно ввиду отсутствия достаточного количества человеческих гормонов. В то же время получение этих гормонов из гипофиза свиней или быков вполне осуществимо.

При использовании бычьего гормона для получения антител существует высокая вероятность того, что индуцированные АТ будут давать выраженную перекрестную реакцию с аналогичным гормоном человека и,

следовательно, окажутся пригодными для постановки специфических проб. Не следует, конечно, ожидать, что антитела к какому-либо определенному белку будут реагировать со структурно неродственным белком; избирательность иммунологических реакций обусловлена их высокой специфичностью. Углеводы, липиды и особенно нуклеиновые кислоты в отличие от белков состоят из сравнительно малого числа структурных элементов, возможность комбинирования которых ограничена по сравнению с белками. Можно с большой степенью вероятности предположить, что вещества такого типа, будучи выделены из разных источников, будут обладать выраженным структурным сходством. С иммунологической точки зрения это означает, что антитела к углеводам, липидам и нуклеиновым кислотам в отличие от АТ к белкам будут активно вступать в перекрестные реакции с филогенетически неродственными антигенами. Подобные взаимодействия отличаются низкой специфичностью, ограничивающей их использование в иммунологических исследованиях. Это порождает необходимость разработки дополнительных тест-систем. Для практической иммунологии можно сделать следующее заключение: антитела к белкам обладают высокой специфичностью, они удобны для определения антигенов; антитела к липидам, углеводам и нуклеиновым кислотам малоспецифичны, что приводит к не всегда желательным перекрестным реакциям. Для получения сывороток с высоким титром АТ необходимо учитывать и соответствующим образом использовать механизмы регуляции гуморального иммунного ответа. Например, введение больших доз антигена может индуцировать образование супрессорных клеток, подавляющих выработку АТ, и, наоборот, использование феномена «иммунологической памяти» может существенно облегчить получение сыворотки с высоким титром антител. Введение антигена приводит не только к образованию антител, но и к появлению «клеток памяти» — лимфоцитов со специфической реактивностью в отношении вызвавшего иммунную реакцию антигена. «Клетки памяти» распространяются по всему организму и оседают в периферических органах лимфатической системы. Повторное введение

антигена приводит к заметному увеличению выработки антител по сравнению с первичным иммунным ответом; антитела вторичного иммунного ответа циркулируют в крови более продолжительное время. Поскольку образование «клеток памяти» — процесс довольно длительный, не следует выбирать слишком маленький промежуток времени между первичным и повторным введением антигена. Показано, что для мышей оптимальный промежуток времени после первого введения АГ составляет 90 дней. Скорость возникновения иммунологической памяти зависит от природы антигена, принято считать что у кроликов и морских свинок она возникает не ранее чем через 6 нед, у крыс и мышей не ранее чем через 4 нед, у низших позвоночных не ранее чем через 3 мес. Гуморальный иммунный ответ можно усилить при помощи адъювантов, этот способ известен давно. Наиболее распространены полный адъювант Фрейнда и гидроокись алюминия. В последнее время в качестве адъювантов применяли мурамилпептиды. Полный адъювант Фрейнда (ПАФ) выпускается в виде коммерческого препарата, в его состав входит минеральное масло, эмульгатор и убитые микобактерии туберкулеза. ПАФ смешивают с водным раствором антигена до получения стабильной водно-масляной эмульсии. На процесс эмульгирования следует обращать особое внимание, так как адъювантный эффект наиболее выражен у стабильных эмульсий. Гидроокись алюминия не обладает столь выраженными стимулирующими свойствами, как ПАФ, но по сравнению с последним имеет то преимущество, что при многократном введении не вызывает изменений в периферических лимфатических органах. Вопрос выбора адъюванта решается в каждом случае индивидуально. По-видимому, идеальные антисыворотки можно получать, используя гибридную технологию, разработанную в лаборатории Мильстайна (Кембридж). Получают клеточные гибриды из лимфоцитов иммунизированного животного и культивируемых *in vitro* миеломных клеток; из полученных гибридов отбирают клоны клеток, синтезирующих определенные АТ. Моноклональные антитела обладают абсолютно одинаковой специфичностью в отличие от поликлональных антител,

содержащихся в обычных сыворотках, имеющих различную специфичность и дающих перекрестные реакции.

Для 99% иммунологов и тех, кто пользуется иммунологической техникой, не существует других животных, пригодных для получения антисывороток, кроме кроликов, морских свинок, крыс и мышей. Это тем более необъяснимо, что еще в начале XX века было известно, что сила иммунного ответа и его специфичность зависят от степени биологической близости животных, от которых получают антиген, и животных — продуцентов антисыворотки. Общих рецептов на этот счет не существует, но можно привести примеры, показывающие, что необходимо тщательно выбирать экспериментальных животных, не ограничиваясь принятыми в обычных случаях видами. В качестве иллюстрации можно привести работу Ван дер Гиссен с соавтрами. В ней были предприняты попытки получить антисыворотки к 4 классам иммуноглобулинов человека. Иммунизации подвергались обезьяны, кролики, морские свинки, бараны, куры и одна коза; для инъекции использовали продукты биосинтеза соответствующих миелом и 3 различные адъюванта. Антисыворотки кур, козы и баранов не обладали субклассовой специфичностью. По отношению к птицам, которые филогенетически далеко отстоят от человека, этого следовало ожидать. Обратная картина должна наблюдаться у обезьян, они филогенетически близки человеку, их иммунная система должна относительно легко улавливать антигенные различия субклассов иммуноглобулинов. И действительно, обезьяны представляют собой удобный источник антисывороток к субклассам IgG2, IgG3 и IgG4, но не IgG1. При получении антисывороток к какому-либо гормону, помимо иммунологических, имеют значение физиологические факторы. В этом случае стараются выбирать животное, наименее чувствительное к данному гормону, поскольку гормональный фон оказывает влияние на иммунный статус организма. Так, например, птицы реагируют на введение гормонов, в том числе инсулина, не так резко как млекопитающие, в то же время они образуют антитела

приблизительно с такой же интенсивностью. В многочисленных экспериментах было установлено, что животные различных инбредных линий по-разному реагируют на один и тот же антиген. В качестве примера, имеющего практическое значение, можно привести работу Shen с соавторами о получении специфических антисывороток к антигенам мембран лимфоцитов. Одни линии и гибриды активно продуцировали антитела, в то время как другие не образовывали их даже в следовых количествах. Низших позвоночных, например рыб, очень удобно использовать для получения антисывороток, хотя они очень удобны в содержании и продуцируют большие количества антител. Рыбы особенно пригодны для работы с так называемыми «консервативными антигенами», т. е. с такими, которые медленно изменялись в ходе эволюции. Медленно эволюционирующие антигены млекопитающих, как правило, не вызывают иммунного ответа у млекопитающих другого вида ввиду минимальных структурных различий. В таких случаях экспериментальных животных нужно выбирать из филогенетически отдаленных классов позвоночных. В частности, карликовый сом продуцирует антисыворотки с высоким титром АТ против групповых антигенов крови человека в ответ на введение им слюны секретеров. Рыбы оказались удобными продуцентами антител, применяемых для изучения филогенетического родства белков иммунохимическими методами. Следует отметить, что у низших позвоночных иммунный ответ зависит от температуры тела. Интенсивное антителообразование наблюдается только при содержании животных у верхней границы физиологических значений температуры. Не последнее место в выборе подопытных животных занимают экономические соображения. Для получения большого количества АТ не всегда есть возможность содержать 100 кроликов или 1 лошадь. С этой точки зрения представляет интерес следующее наблюдение: беременных коров можно иммунизировать без вреда для плода, после отела удастся получить несколько литров молозива, в котором содержание антител в несколько раз превышает их концентрацию в

сыворотке крови. Эту технологию использовали для получения больших количеств АТ к Н-антигену сальмонелл, ферритину, IgG кролика и человека.

Лекция № 13

Тема лекции: Диагностикумы для серодиагностики инфекционных заболеваний

Определение в сыворотке крови больных специфических антител, получившее наименование серодиагностики, является одним из важнейших дополнительных методов распознавания некоторых инфекционных заболеваний. Однако имеющиеся в крови здоровых людей так называемые нормальные, а также анамнестические или прививочные антитела снижают ценность серодиагностики многих инфекционных заболеваний.

В качестве антигена для определения специфических антител существуют разного рода диагностикумы, старейшим из которых является гомогенная взвесь убитых микробов, применяемая в реакции агглютинации в пробирках (реакции Видаля, Райта и др.) или на стекле (реакция Хеддлсона). Последние годы широкое распространение получили эритроцитарные диагностикумы, где антигены фиксированы на эритроцитах, которые используют в РИГА и РТПГА. Существуют и так называемые антительные эритроцитарные диагностикумы для обнаружения антигенов. Отдельную группу составляют неспецифические антигены для серологической диагностики сифилиса, используемые в РСК и реакции флоккуляции.

Условия производства. При планировании рабочих помещений необходимо соблюдать условия поточности производственного процесса каждого вида диагностикумов. Например, должны быть оборудованы помещения для работы с бактериальными культурами (боксы, термостаты и пр.), химическая лаборатория, комнаты для работы врачей, лаборантов, холодильные камеры, центрифужные, помещение для контроля готовой продукции (лаборантские, бокс для посева на стерильность, термостат) и др. Подопытных животных (кролики, бараны) содержат по общим правилам, соответствующим требованиям ветсаннадзора. Особое внимание должно быть обращено на технику противопожарной безопасности при изготовлении спиртовых диагностикумов.

Бактериальные диагностикумы и монодиагностикумы. Основным условием для изготовления диагностикумов, так же как и агглютинирующих сывороток, является тщательная подготовка и селекция производственных штаммов с отбором колоний в гладкой форме и преобладанием необходимого антигена. Это обеспечивает хорошую агглютинабельность диагностикумов, их специфичность и стабильность гомогенности микробных взвесей. Вопросы селекции, культивирования и хранения производственных штаммов те же, что и при изготовлении агглютинирующих сывороток.

В зависимости от наших знаний об объективно существующем разнообразии антигенной структуры возбудителей инфекционных заболеваний постепенно повышается специфичность получаемых диагностических препаратов. В настоящее время из цельных микробных клеток готовят диагностикумы из бактерий, имеющих известную антигенную обособленность, тогда как другие препараты содержат антигены с преобладанием отдельных структурных элементов. Последнего достигают методом селекции штаммов и обработки бактерий соответствующими агентами. Так, А. С. Зуевым и соавт. (1956) разработаны методы, позволяющие получать сальмоионеллезные Н-монодиагностикумы (а, б, с, d и др.), 0-диагностикумы серогрупп АВОДЕiE₂ с преобладанием определенного 0-антигена (4, 9 и т. д.). Эти препараты с успехом применяют для постановки аналитической реакции Видаля при серодиагностике заболеваний, вызванных различными сальмонеллами.

В зависимости от физико-химических свойств отдельных антигенов бактерий для их стерилизации и консервирования применяют различные вещества. Сальмонеллезные Н-диагностикумы, туляремиальный, бруцеллезный, коклюшный и большинство других диагностикумов являются формализированными взвесями (Н. А. Хоменко, 1964; Р. А. Салтыков, 1973, и др.). В связи с малой устойчивостью Vi-антигена к различным воздействиям, в том числе к формалину, при изготовлении диагностикума

перед формализацией Vi-антиген стабилизируют 25 % раствором хлорида кальция (А. С. Зуев, 1959).

O-диагностикумы готовят путем обработки микробов спиртом или глицерином. Некоторые диагностикумы, например бруцеллезный, подкрашивают анилиновыми красителями, что облегчает чтение реакции.

Готовые препараты проверяют на стерильность, агглютинабельность (с гомологичными иммунными сыворотками) и специфичность (с гетерологичными сыворотками, сыворотками лихорадящих больных и здоровых людей). Бактериальные диагностикумы при хранении несколько снижают агглютинабельные свойства, могут частично лизироваться или утрачивать гомогенность, что ограничивает срок их годности, поэтому целесообразно подвергать их лиофилизации. Однако этот метод не нашел широкого применения для производства диагностикумов, содержащих бактериальные клетки.

В сухом виде готовят диагностикумы из растворимых антигенов, применяемых в РСК при серодиагностике лептоспироза, склеромы и других заболеваний.

Эритроцитарные диагностикумы. Новые возможности для серологической диагностики создает реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), которая основана на применении эритроцитарных диагностических препаратов. Последние представляют собой комплексное соединение эритроцитов с антигенами или антителами, стабилизированное растворами формалина или лиофилизацией. Основное преимущество этих препаратов состоит в их высокой чувствительности, достаточной специфичности демонстративное™ и простоте постановки реакций, быстроте получения результата.

В зависимости от природы присоединяемого вещества (гемосенситина) эритроцитарные диагностические препараты можно разделить на три группы: 1) с полисахаридными гемосенситинами; 2) с белковыми и фосфатидными сенситинами; 3) иммуноглобулиновые препараты

(эритроциты с присоединенными антителами сывороток). Диагностикумы первых групп применяют для определения титров антител в сыворотках крови в РПГА. Они могут быть использованы и для выявления антигенов с помощью реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА). Препараты последней группы используют для индикации антигенов. В настоящее время существует более 40 наименований эритроцитарных диагностикумов, на которые утверждена техническая документация. Однако набор выпускаемых препаратов не столь велик. В практику здравоохранения внедрены эритроцитарные дизентерийные антигенные диагностикумы Sh. sonnei, Sh. flexneri, Sh. newcastle, набор сальмо-неллезных 0-диагностикумов 6 основных групп, туляремийный и бруцеллезный эритроцитарные препараты. Эритроцитарные диагностические препараты выпускаются в жидком и сухом виде.

Процесс приготовления эритроцитарных диагностических препаратов складывается из трех или четырех (для сухих форм) основных этапов.

1. Стабилизация эритроцитарной взвеси. Обычно осуществляется растворами формалина или акролеина (Ф. С. Носков, Б. К. Гаврилик, 1970; Weinbach, 1958; Feeley et al., 1958).

2. Получение антигена (сенситина). Этот этап является наиболее существенным моментом приготовления эритроцитарного препарата. Эритроцитарные диагностикумы в конечном счете различаются по способу приготовления сенситина и методу присоединения к поверхности носителей. Сенситины, применяемые для приготовления 1-й группы диагностикумов, имеют полисахаридную природу. Методы экстрагирования бактериальных полисахаридов многообразны (Е. А. Петросян, 1961), но для бактерий кишечной группы инфекций обычно используют щелочной гидролиз комплексного антигена, приготовленного по методу Буавена или Вестфalia и (3-нафтольную экстракцию микробной взвеси. Следует отметить, что не существует универсального метода выделения полисахаридов, пригодного для сенсibilизации эритроцитов: в каждом случае требуется подбирать

оптимальный. Сенситины, используемые для приготовления препаратов 2-й группы, могут быть фоефолипидами и белками. Метод приготовления фоофатидных антигенов ми-кобактерий туберкулеза описан Takahashi (1962). В качестве белковых сенситинов указанной группы диагностикумов используют бактериальные белковые антигены, коммерческие препараты гормонов, сывороточных и тканевых белков. Сенситины для 3-й группы эритроцитарных диагностических препаратов — сывороточные иммуноглобулины. Методы их приготовления подробно изложены в соответствующих руководствах по иммунохимии (Э. Кэбот, М. Майер, 1968; К. Х. Хаджиев, 1971).

3. Присоединение сенситина к носителю — процесс, наиболее изученный применительно к сенситинам полисахаридной природы. Он укладывается в рамки простой физико-химической адсорбции. При этом имеет место разрушение некоторых внутримолекулярных и образование межмолекулярных водородных связей, что ведет к развитию относительной комплементарности молекул сенситина с эритроцитарными рецепторами (Б. В. Каральтшк, 1976). Это обстоятельство обуславливает прочность комплекса «эритроцит — сенситин полисахаридной природы».

Для приготовления эритроцитарных диагностикумов для серологической диагностики кишечных инфекций прочная сенсibiliзация обычно достигается инкубацией смеси равных объемов 10% взвеси эритроцитов и раствора антигена в оптимальной концентрации при 37°C в течение 1 ч. При создании сложных трехкомпонентных препаратов 2-й и 3-й групп процесс присоединения сенситина к поверхности эритроцитов усложняется. Белковые и фосфатидные антигены не сорбируются на поверхности необработанных эритроцитов, для их присоединения нужны «посредники»: таниновая кислота, биодиазотиру-ванный бензин (БДБ), хлорный хром (ХХ), глутаровый альдегид (ГА) и др. Механизм присоединения в каждом случае различен. Таниновая кислота модифицирует поверхность эритроцитов и обеспечивает непрочную связь с антигеном за

счет вандерваальсовых сил. БДБ, ХХ, ГА создают прочную фиксацию антигена за счет химической связи между поверхностями эритроцита и сенситина. Вместе с тем следует особо подчеркнуть, что не все «посредники» носят универсальный характер, поэтому при приготовлении препаратов 2-й и 3-й групп нужно подбирать метод.

Таким образом, процесс присоединения складывается из двух стадий: подготовки поверхности эритроцитов конъюганта-ми и собственно присоединение антигенов в оптимальной концентрации. На этом последнем этапе заканчивается изготовление эритроцитарных препаратов, выпускаемых в жидкой форме. Сухие эритроцитарные препараты требуют еще одного этапа — лиофилизации в защитном растворе (сахарозе с декстраном и др.).

Описание метода изготовления сухого эритроцитарного диагностикума для определения антиглобулинов и применения дано И. А. Григорьевой и соавт. (1975).

Неспецифические антигены. Упомянутые до сих пор диагностикумы характеризуются специфической реакцией между антигеном и антителом. Для серодиагностики сифилиса употребляют препараты, играющие роль диагностикумов, но не имеющие специфических антигенов.

Антигены для диагностики сифилиса различают по способу приготовления спиртовых экстрактов из бычьего сердца. Антиген Вассермана и кардиолипиновый антиген используют для РСК, применение которой основано на представлении о возникновении у больного антител, которые, соединившись с липидами, образуют комплекс, фиксирующий комплемент. Применение антигенов Кана и Закса — Витебского (осадочные антигены) основано на преципитации глобулинами сифилитической сыворотки липидов антигена. Разница между этими антигенами заключается в разной степени дисперсности антигена (Л. С. Резникова, 1953). Следует отметить, что существует специфический «паллида-антиген», получаемый из культуры спирохет, но не получивший широкого распространения из-за трудности культивирования последних (У. Бойд, 1969).

Неспецифическая природа антигенов, употребляемых для серодиагностики сифилиса, приводит, по-видимому, к появлению ложноположительных реакций (у беременных, онкологических больных, при лепре, малярии, у детей при острых инфекционных заболеваниях и т. д.). В связи с этим контроль «специфичности» антигенов должен проводиться достаточно строго: выпускаемые антигены контролируют в РСК или осадочных реакциях со 150 человеческими сыворотками (в том числе сыворотками здоровых людей и больных всеми формами сифилиса). Кроме того, антигены для РСК контролируют на отсутствие антикомплементарности и гемотоксичности.

Специфические антигены из *Tr. pallida* рекомендуется применять для подтверждения положительных реакций, полученных с неспецифическими антигенами (Satz, 1975).

Детали технологического процесса изготовления диагностикумов всех видов, выпускаемых в нашей стране, изложены в утвержденных на них ТУ и регламентах производства.

Лекция 14

Тема лекции: Иммунологические методы

Современные иммунологические методы, используемые для обнаружения и идентификации микроорганизмов и токсинов, весьма разнообразны. Однако все они базируются на реакциях специфического взаимодействия гомологичных антигенов и антител.

Иммунологические методы подразделяются на:

1. Методы иммунопреципитации
2. Иммуноагглютинации
3. Иммунолюминисцентные
4. Радиоиммунологические
5. Иммуноферментные

Из литературы известно, что антигены представляют собой сложные полимерные соединения белковой, полисахаридной или иной природы, несущие признаки генетически чужеродной информации и способные вызывать в макроорганизме образование антител, а также инициировать другие иммунологические процессы. Их специфическая активность сопряжена с наличием так называемых аллостерических центров, состоящих из аминокислотных остатков, имеющих определённую пространственную конфигурацию. Каждый антиген может иметь один или несколько таких центров, способных вступать во взаимодействие с комплементарными участками антител или выполнять функцию связующей группы.

Любая бактериальная клетка несёт множество антигенных детерминант. Наряду с антигенами, неотъемлемыми компонентами иммунологических реакций являются антитела. Они представляют собой белки глобулярной природы, образующиеся в организме позвоночных в ответ на антигенную стимуляцию. Синтезируются и секретируются иммуноглобулины плазматическими клетками, которые представляют собой заключительную форму дифференцировки В-лимфоцитов.

Важнейшие свойства антител связаны с наличием у них активных центров – особых участков молекул, обычно образованных несколькими аминокислотами полипептидной цепи, которые по своей пространственной конфигурации гомологичны определённым антигенным детерминантам и способны вступать с ними в специфическое взаимодействие по типу "ключ - замок".

Антитела могут содержать один, два и более активных центра, то есть быть моно-, би- или поливалентными. По происхождению их можно подразделить на моно- и поликлональные, а по специфичности – на моно- и полиспецифичные.

Основными источниками антител при разработке и производстве диагностических препаратов и тест-систем являются сыворотки крови гипериммунизированных животных, а также культуральная жидкость, получаемая при выращивании "in vivo" или "in vitro" гибридных клеток. В последние годы активно изучается возможность использования для указанных целей и так называемых микроантител, синтезируемых генетически модифицированными бактериальными клетками.

Взаимодействие компонентов иммунологических реакций происходит в водной среде или геле в присутствии электролитов. При этом оно может осуществляться как в гомогенной (жидкой) фазе, так и на границе жидкой и твёрдой фаз. В последнем случае иммунореагенты иммобилизуют на твёрдофазном носителе, например, на поверхности лунок полистироловых микропланшетов.

В процессе реагирования антигены и антитела формируют иммунные комплексы, выявление которых является основной задачей для любого вида иммуноанализа. При определённых условиях последние могут выпадать в осадок или образовывать линии преципитации, что существенно упрощает учёт результатов реакций. Однако часто при постановке иммунологических тестов указанные феномены могут не наблюдаться. Особенно это характерно

для тех случаев, когда антигены и антитела взаимодействуют в низких концентрациях. В связи с этим с целью обеспечения возможности эффективной регистрации результатов исследований соответствующие иммунореагенты либо иммобилизуют на поверхности тех или иных носителей (например, эритроцитов, частиц латекса, бентонита, ализарина, угля), либо конъюгируют с различными веществами, обладающими выраженной химической или физической активностью (например, с ферментами, люминофорами, радиоизотопами). При этом характер используемых меток в значительной мере определяет тип иммуноанализа и его методические особенности.

Иммуноферментные методы

Разработка первых отечественных тест-систем, основанных на принципах ИФА и предназначенных для определения патогенных бактерий, относится с периоду с 1980 по 1990 г.г.

Основы иммуноферментных методов были разработаны в 1971 г. тремя независимыми группами исследователей: Е. Engvall et P. Perlmann - в Швеции, В.К. Van Weemen et А.Н. Schuurs - в Нидерландах и К. Rubinstein et al. - в США. Характерной особенностью такого рода тестов является использование при их постановке специфических иммунореагентов, конъюгированных с ферментами. При этом в указанных соединениях антигены и антитела сохраняют свои основные иммунологические свойства, а ферменты – способность к расщеплению субстратов.

В настоящее время предложены десятки различных вариантов постановки иммуноферментных реакций. Однако при этом все виды ИФА, можно классифицировать на две группы: гомогенные (без разделения компонентов) и гетерогенные (с разделением компонентов).

В основе гомогенных методов находится принцип определения иммунных комплексов по изменению физико-химических свойств молекул

ферментных меток. При этом функцию носителя последних в такого рода системах, как правило, выполняют гаптены. Всё многообразие существующих модификаций гомогенного ИФА сопряжено с тем или иным способом модуляции ферментативных реакций, например, со стерическим исключением субстрата, изменением конформации активных центров энзимов, стимуляцией ингибиторов.

Гетерогенные иммуноферментные тесты базируются на применении антигенов и антител, иммобилизованных на поверхности твёрдофазного носителя. Учитывая это обстоятельство, их часто называют твёрдофазными. Такой методический подход обеспечивает быстрое и эффективное разделение иммунореагентов после их взаимодействия.

В зависимости от характера используемых иммунологических реакций методы ИФА подразделяют на конкурентные и неконкурентные. При этом, если первые предполагают применение реакционных систем с блокированием меченого лиганда исследуемой пробой, то вторые сопряжены со способностью антигенов к одновременному связыванию нескольких молекул антител, в том числе и конъюгированных с ферментом, за счёт имеющихся у них двух и более активных центров специфического взаимодействия.

Согласно данным литературы, гомогенные варианты ИФА, как и другие иммунологические тесты без разделения компонентов, используют преимущественно в фармакологии и эндокринологии для определения различных видов веществ, относящихся к разряду гаптенных. Что же касается микробиологических и токсикологических исследований, связанных с обнаружением и идентификацией микроорганизмов и биологических ядов, то здесь полностью доминируют твёрдофазные иммуноферментные методы. При этом осуществляют постановку как конкурентных, так и неконкурентных реакций.

Принцип прямого гетерогенного конкурентного ИФА заключается в следующем. На первом этапе в результате химического или физико-

химического взаимодействия к носителю прикрепляют антитела к искомому антигену, избыток которых удаляют путём отмывания. Затем вносят тестируемую пробу и известное количество антигена, меченного ферментом, который конкурирует за центры связывания антител. По окончании реакции образовавшиеся иммунные комплексы оказываются присоединёнными к твёрдой фазе. Избыток антигена удаляют отмывкой и добавляют субстрат для энзима. По истечении определённого времени ферментативную реакцию останавливают и проводят колориметрическую или люминометрическую регистрацию её результатов. При этом количество образовавшихся продуктов энзимного взаимодействия обычно бывает обратно пропорциональным концентрации выявляемого антигенного вещества.

Существует также и другая модификация вышеназванного вида исследований, которая предполагает первичную иммобилизацию на твёрдофазном носителе антигена. В этих случаях, после удаления его избытка путём отмывания, в реакционную систему вносят анализируемый материал и меченые ферментом антитела. При этом связывание последних может тормозиться соответствующими специфическими иммуноглобулинами, если они присутствуют в тестируемой пробе.

Представленные ранее варианты прямого твёрдофазного конкурентного ИФА отличаются простотой выполнения и относительно сжатыми сроками получения результатов, поскольку предполагают одномоментное внесение иммуноферментного конъюгата и искомого антигена или антител. Однако по чувствительности они заметно уступают непрямым разновидностям данного вида тестов, которые предусматривают двухэтапное проведение анализа. На первом этапе определяемый и меченый лиганды взаимодействуют до установления равновесного состояния с соответствующими антителами или антигенами. На втором – полученная реакционная смесь наносится на поверхность твёрдофазного носителя, содержащую тот или иной иммунореагент. В результате, непрореагировавший меченый лиганд оказывается присоединённым к

твёрдой фазе. При этом его количество, соответственно, будет прямо пропорциональным концентрации выявляемого лиганда.

Помимо рассмотренных выше методических приёмов, связанных с постановкой конкурентного гетерогенного ИФА, известны и другие многочисленные варианты проведения данного вида исследований. Каждый из них обладает определёнными положительными и отрицательными качествами. Общим же недостатком всех вышеназванных тестов является необходимость использования в соответствующих реакционных системах препаратов очищенных антигенов, что служит существенным ограничением для применения этой группы методов при решении задач, связанных с обнаружением и идентификацией микроорганизмов. Вместе с тем указанная проблема не имеет принципиального значения для неконкурентного ИФА с разделением компонентов, наиболее распространённой модификацией которого является так называемый "сэндвич"-вариант. Практическая реализация такого рода анализа предполагает выполнение нескольких последовательных операций. На первом этапе на твёрдой фазе иммобилизуют специфические иммуноглобулины против определяемого антигена. На следующем – в жидкой фазе вносят исследуемый материал, содержащий искомый антиген. Третий этап предполагает добавление соответствующих антител, меченных ферментом. В результате, по количеству энзима, оставшегося на твёрдой фазе после отмывания, можно установить концентрацию в пробе выявляемого лиганда.

Данная схема постановки ИФА более длительная по времени и предусматривает большее число операций по сравнению с конкурентными видами реакций. Однако при этом она обладает рядом очевидных достоинств. Наиболее существенное из них сопряжено с высокой чувствительностью указанного иммуноферментного теста. По этому показателю он заметно превосходит другие известные варианты гетерогенного ИФА. Ещё одним преимуществом рассматриваемого метода

является то, что, благодаря стадии отмывки, выполняемой после проведения первой реакции антиген-антитело, он позволяет анализировать материалы, содержащие субстраты и ингибиторы фермента-маркёра. К тому же, как уже было отмечено ранее, этот тест эффективен при определении веществ, имеющих множество антигенных детерминант, например, бактериальных клеток.

Вполне закономерно, что с учётом вышеперечисленных качеств "сэндвич"-вариант ИФА нашёл широкое применение в практике лабораторных исследований, включая диагностику опасных инфекционных заболеваний. В настоящее время на его основе сконструировано подавляющее большинство иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления различных биологических агентов бактериальной и токсинной природы.

При постановке некоторых модификаций гетерогенного ИФА для определения иммунных комплексов используют меченые энзимом антивидовые антитела, специфичные в отношении иммуноглобулинов класса G того или иного вида животных или человека. Это позволяет применять один и тот же иммуноферментный конъюгат при исследовании разных антигенных веществ. Аналогичный результат может быть также достигнут и путём выявления иммунореагентов, участвующих в первичной реакции и иммобилизованных на твёрдой фазе, с помощью меченого энзимом комплемента свинок или стафилококкового протеина А. Такие универсальные конъюгаты делают ИФА более доступным, особенно в тех случаях, когда возникает необходимость параллельного тестирования пробы по широкому спектру выявляемых биологических агентов.

В качестве меток антигенов и антител в ИФА используют разные виды энзимов. При этом последние должны отвечать следующим основным требованиям:

1. проявлять высокую активность и стабильность в условиях проведения анализа;
2. характеризоваться чувствительностью и простотой методов определения продуктов или субстратов ферментативной реакции;
3. сохранять основные свойства при связывании с иммунореагентами;
4. отсутствовать в исследуемых материалах, а также не содержать в них своих ингибиторов и субстратов
5. быть доступными при достаточно высоких степенях очистки.

С учётом указанных критериев, в настоящее время в практике иммунохимических исследований для маркировки антигенов и антител чаще всего применяют пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и β -D-галактозидазу. При этом в большинстве случаев предпочтение отдаётся первому из вышеназванных веществ. Его основные преимущества, по сравнению с другими ферментами, связаны с более простым и дешёвым способом получения и очистки, низкой молекулярной массой, относительно высокой стабильностью при хранении, а также с наличием большого числа разнообразных хромогенных и флуорогенных субстратов.

Соединение энзимов с иммунологически активными белками осуществляют разными способами: путём так называемой химической "сшивки", а также с помощью ковалентного и нековалентного связывания.

В большинстве случаев регистрация результатов иммуноферментных реакций основана на спектрофотометрическом измерении оптической плотности субстрата или продукта энзимного взаимодействия, образовавшегося за определённый промежуток времени. Для этих целей могут быть использованы как вертикальные абсорбциометры, так и обычные спектрофотометры и фотоэлектроколориметры. Если же данная тест-система предполагает применение флуорогенной субстратно-индикаторной смеси, то учёт результатов анализа осуществляют с помощью специальных приборов-люминометров. Исследования качественного характера допускают

возможность визуальной оценки результатов ферментативной реакции.

Учитывая вышеизложенное, чувствительность ИФА может варьировать в весьма широком диапазоне значений. Согласно данным литературы, у разных видов иммуноферментных реакций при выявлении корпускулярных антигенов бактериального происхождения она находится в пределах от 10 тыс. до 1 млн м.к./мл. Многие отечественные и зарубежные авторы отмечают, что иммуноферментные тесты в 10-100 раз чувствительнее РНГА и её модификаций и в этом отношении соответствуют радиоиммунологическим методам. При этом продолжительность данного вида исследований может составлять от 20-30 мин до 3-4 ч.

Лекция 15

Тема лекции: Молекулярно-генетические методы

Согласно современным представлениям индивидуальность всех живых существ, в том числе и бактерий, в первую очередь обусловлена спецификой их генетической структуры. Весь объём информации, кодирующей морфологические и функциональные особенности того или иного биологического субъекта, шифруется в молекулах ДНК в виде строго определённого чередования четырёх нуклеотидных оснований: аденина, тимина, гуанина и цитозина. Сформированная таким образом нуклеотидная последовательность генома для любого макро- или микроорганизма фактически является тем уникальным маркёром, с помощью которого он может быть идентифицирован.

Из литературы известно, что молекула ДНК состоит из двух комплементарных цепей нуклеотидов, которые соединены между собой водородными связями, образующимися между пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями: аденином и тимином или гуанином и цитозином.

Если молекулу ДНК нагреть до температуры от плюс 80 до плюс 100 °С или обработать щёлочью, она денатурирует. При этом нарушаются водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями и происходит расхождение составляющих её цепей. В случае последующего охлаждения указанной реакционной смеси молекула ДНК вновь восстанавливает свою двухцепочечную структуру, причём при условии строгого соблюдения принципа комплементарности.

Если к денатурированной ДНК добавить фрагмент такой же нуклеиновой кислоты, но в одноцепочечной форме, то в процессе ренатурации он будет конкурировать с одной из цепей исследуемой ДНК и в ряде случаев соединится со второй цепью в гомологичном ему участке. Данная реакция воссоединения комплементарных фрагментов нуклеиновых

кислот получила название реакции реассоциации, или гибридизации. Именно она и является той основой, на которой базируются молекулярно-генетические методы идентификации живых организмов, в том числе и бактерий.

Проведение указанных исследований предполагает использование так называемых ДНК- или РНК-зондов, представляющих собой меченые тем или иным способом поли- или олигонуклеотиды, специфичные по отношению к выявляемым генам или их фрагментам.

Как отмечают специалисты, молекулярно-генетический зонд должен содержать не менее 25 оснований, чтобы обеспечить возможность образования устойчивого гибрида. На практике, в зависимости от целей исследований, его размер обычно ограничивается 30-5000 нуклеотидных последовательностей. При этом он, безусловно, должен обладать высоким уровнем соответствия с мишенью, хотя полной гомологии не требуется.

В настоящее время технология получения молекулярно-генетических зондов достаточно хорошо разработана. Известны два основных подхода к решению этой задачи. Во-первых, можно синтезировать копию ДНК на детектируемой молекуле ДНК с помощью ДНК-полимеразы, во-вторых – на выявляемой молекуле РНК с помощью обратной транскриптазы. При этом изготовленная в небольших количествах ДНК-копия может быть размножена с использованием техники клонирования в составе каких-либо бактерий, например, *E. coli*.

Другой перспективный приём конструирования нуклеотидных зондов основан на синтезе соответствующих фрагментов молекул РНК с помощью РНК-полимераз бактериофагов SP6 и T7 на двунитевой матрице, содержащей необходимую последовательность. По данным литературы, преимуществом РНК-зондов является более высокая стабильность дуплексов ДНК-РНК по сравнению с дуплексами ДНК-ДНК. Однако на сегодняшний день они менее доступны, чем ДНК-зонды, поскольку их получение более трудоёмко.

Ещё один путь создания вышеназванных препаратов – это химический

синтез. Имеются хорошо зарекомендовавшие себя способы конструирования олигонуклеотидов любой комплементарности с помощью автоматических ген-синтезаторов. Наиболее распространённым из них является фосфоамидитный метод, основанный на применении мономеров общей формулы.

Сравнивая между собой поли- и олигонуклеотидные зонды, следует отметить, что последние имеют ряд очевидных достоинств. Они характеризуются более высокой скоростью гибридизации с мишенью и в них проще вводить различные типы меток. Основной же их недостаток сопряжён с тем, что использование таких препаратов возможно только в тех случаях, когда известна первичная структура выявляемой нуклеиновой кислоты или, по крайней мере, значительной её части.

Касаясь особенностей конструирования нуклеотидных зондов, предназначенных для обнаружения и идентификации микроорганизмов бактериальной природы, следует отметить, что эти работы реализуются в следующих основных направлениях:

получение препаратов, комплементарных определённому видо- или родоспецифическому гену;

синтез ДНК (РНК)-молекул, гомологичных мультикопийным резидентным плазмидам или генам рибосомальной РНК;

синтез нуклеотидных последовательностей для гибридизации с генами, кодирующими тот или иной признак, например, синтез токсина.

По мнению разных специалистов, наиболее предпочтительным является подход, связанный с созданием зондов к уникальным фрагментам бактериальных хромосом, которые, помимо структур, отвечающих за видовые признаки, содержат и так называемые "молчащие" гены, наименее подверженные давлению естественного отбора.

Чтобы обеспечить возможность регистрации результатов реакции гибридизации в состав олиго- или полинуклеотидов, представляющих собой

молекулярно-генетические зонды, вводят тот или иной маркер. Как и в иммунологических тестах, в качестве меток могут выступать радиоактивные изотопы, флуорогенные вещества, ферменты, элементы авидин-биотинового комплекса. Их внесение в соответствующую нуклеотидную последовательность осуществляется разными способами. Обычно это достигается за счёт так называемых репортерных групп, представляющих собой дополнительные фрагменты зондов ненуклеотидной природы.

Согласно данным литературы, наиболее высокую чувствительность метода гибридизации обеспечивает применение радиоактивных маркеров. Чаще других используют изотоп фосфор³². Однако общим недостатком такого рода меток является их нестабильность и та опасность, которую они представляют для персонала соответствующих лабораторий и окружающей среды. Учитывая это обстоятельство, до сих пор проводятся многочисленные исследования, направленные на создание зондов, пригодных для определения нерадиометрическими средствами. Как уже было отмечено ранее, с этой целью в них вводят различные флуорохромы, в том числе и ионы редкоземельных элементов, в первую очередь европия, хорошо зарекомендовавшего себя в иммунофлуоресцентных тестах с временным разрешением.

Имеются также сообщения, свидетельствующие о перспективности внедрения в лабораторную практику зондов, содержащих биотин, авидин или стрептавидин, а также ферменты: пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу.

Существует несколько вариантов проведения гибридизационного анализа. Традиционный способ состоит из следующих этапов: первоначально исследуемый образец связывают с нерастворимым носителем (чаще всего с нитроцеллюлозным или нейлоновым фильтром), затем следует процедура гибридизации с зондом, после этого отмывка от избытка последнего и регистрация полученных результатов тем или иным методом, в зависимости от характера используемой метки.

В настоящее время опубликовано значительное число работ,

указывающих на возможность внедрения реакции гибридизации нуклеиновых кислот в различные области микробиологии, включая лабораторную диагностику опасных бактериальных инфекций. Так, например, имеются данные, свидетельствующие о создании высокоэффективных нуклеотидных зондов, пригодных для идентификации возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы. При этом в некоторых случаях сконструированные препараты оказались настолько специфичными, что даже позволяли проводить межштаммовую дифференциацию патогенов.

Однако, оценивая чувствительность гибридизационного анализа, следует отметить, что она весьма невысока и обычно находится в пределах от 100 тыс. до 1 млрд м.к. в тестируемой пробе. К тому же, этот метод требует сравнительно больших затрат времени на свою постановку, поскольку процесс гибридизации относительно длителен. Он занимает от 18 ч до 24 ч, и пока не найдено способов, позволяющих существенно его ускорить.

Очевидно, что более совершенным в этом отношении является другой вид молекулярно-генетических исследований, основанный на направленной амплификации нуклеиновых кислот. Как и метод ДНК(РНК)-зондов, он базируется на способности к комплементарному связыванию гомологичных нуклеотидных цепей. Однако в отличие от него, данный анализ предполагает многократное умножение (амплификацию) тестируемого фрагмента нуклеиновой кислоты. Достигается это за счёт способности последней к самокопированию с помощью полимераз. В результате в течение нескольких часов удаётся получить десятки и даже сотни миллионов копий определяемой нуклеотидной структуры, детекция которых становится возможной с использованием любых доступных тестов.

Впервые указанный способ, получивший название полимеразной цепной реакции, был предложен американцем Кэри Муллисом. За его разработку в 1993 г. он был удостоен Нобелевской премии в области химии.

ПЦР – это циклический процесс, при котором в каждом цикле происходит удвоение числа выявляемых участков нуклеиновых кислот.

Анализ проводят следующим образом. Исследуемую молекулу ДНК путём нагревания до температуры плюс 94 - плюс 95 °С разделяют на две отдельные цепи (стадия денатурации). После этого в тестируемую пробу вносят до нескольких миллионов искусственно синтезированных олигонуклеотидов (праймеров) двух типов. Одни из них должны быть гомологичны началу одной цепи ДНК, другие – концу второй. За счёт комплементарности при охлаждении до температуры плюс 54 - плюс 56 °С праймеры соединяются с соответствующими цепями нуклеиновой кислоты (стадия отжига). На следующем этапе исследований реакцию смесь нагревают до температуры от плюс 70 до плюс 75 °С и добавляют в неё фермент – термостабильную ДНК-полимеразу. Последняя достраивает за каждым праймером вторую цепь (стадия синтеза). В результате, получаются уже две двухцепочные молекулы ДНК, то есть за время одного цикла происходит удвоение выявляемой нуклеотидной структуры. При этом каждая из вновь синтезированных цепей ДНК в последующих циклах сама выступает в качестве матрицы для конструирования соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты. Учитывая это обстоятельство, проведя, например, 20 циклов амплификации, можно увеличить число копий идентифицируемого участка ДНК в миллион и более раз.

Праймеры (или как их ещё называют – "затравки"), используемые при постановке ПЦР, обычно содержат 20-30 нуклеотидов. При этом эффективный анализ возможен только в тех случаях, когда установлена их оптимальная структура, фланкирующая строго специфичные участки ДНК определяемых микроорганизмов. Лучшие результаты в таких исследованиях обеспечивает ДНК-полимераза, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*. Максимальный уровень её активности соответствует температуре от плюс 70 до плюс 75 °С, что исключает необходимость добавления свежей порции фермента после каждого цикла амплификации, а также создаёт условия для более специфичного взаимодействия затравки с матрицей.

Согласно данным литературы, на сегодняшний день, как в нашей стране, так и за рубежом, метод ПЦР нашёл широкое применение при разработке различных диагностических тест-систем, предназначенных для обнаружения и идентификации многих возбудителей опасных инфекционных заболеваний. В настоящее время сконструированы соответствующие препараты для выявления бактерий чумы, сибирской язвы, холеры, туляремии, легионеллёза, бруцеллёза, сапа, мелиоидоза, а также ряда биологических агентов вирусной и риккетсиозной природы.

По заключению специалистов, работающих в этой области, реакция направленной амплификации фрагментов нуклеиновых кислот позволяет определять микроорганизмы при их содержании в исследуемых пробах на уровне нескольких сотен микробных клеток. При этом анализ характеризуется высокой специфичностью, а его продолжительность обычно не превышает 4-6 ч. В ряде случаев он даже обеспечивает индикацию патогенов, когда это сделать другими способами не представляется возможным. Однако, несмотря на высокую эффективность, ПЦР нельзя рассматривать в качестве альтернативы по отношению к другим лабораторным тестам. По мнению разных авторов, она лишь дополняет их на соответствующих этапах исследований, функционируя в рамках общепризнанных схем обнаружения и идентификации тех или иных возбудителей инфекционных заболеваний. При этом данную реакцию пока ещё с полным основанием можно отнести к разряду прецизионных. Её адекватная реализация с получением достоверных результатов возможна только в условиях специализированных лабораторий при наличии высококвалифицированного персонала. Кроме того, она непригодна для определения многих опасных биологических агентов, не содержащих нуклеиновые кислоты, например, токсинов, прионных белков, регуляторных пептидов.

Таким образом, обобщая вышеизложенное, можно заключить, что молекулярно-генетические методы, и в первую очередь ПЦР, являются

перспективными высокочувствительными и специфичными тестами, позволяющими эффективно выявлять разные виды микроорганизмов. Однако они приемлемы только для анализа проб, содержащих нуклеотидные структуры, и в этом отношении их диагностические возможности по сравнению с другими видами лабораторных исследований, например, иммунохимическими реакциями, представляются заметно ограниченными.