

## **Метрология, стандартизация, контроль**

УДК 579.61:616-078.002.2

А.С. ГЕОГДЖАЯН, И.В. ЖАРНИКОВА\*, Т.В. ЖАРНИКОВА, Д.В. ЕФРЕМЕНКО, М.Е. МИХАЙЛОВА

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, 355106

e-mail: IVJ-biotech@yandex.ru

### **Иммобилизованные ферменты и их применение в производстве диагностических тест-систем для выявления возбудителей инфекционных заболеваний**

Определены оптимальные условия получения высокостабильных и специфичных (не участвующих в перекрестных реакциях) иммобилизованных иммунопероксидазных конъюгатов при использовании в качестве носителей липосом и алюмосиликата. Показана перспективность иммобилизации носителей с ферментом и иммуноглобулинами. Иммунопероксидазные конъюгаты апробированы при иммуноферментном анализе на гомо- и гетерологичных штаммах возбудителей туляремии и лептоспироза. Срок годности (равный сроку наблюдения) разработанных препаратов увеличивается до 5 лет для липосомных и до 3 лет для алюмосиликатных иммунопероксидазных конъюгатов без снижения чувствительности и специфичности, что значительно превышает срок годности традиционных иммунопероксидазных конъюгатов (1 год).

*Ключевые слова:* активность, алюмосиликат, иммобилизованные иммунопероксидазные конъюгаты, иммуноглобулины, липосомы, специфичность, фермент.

Принципиально новые перспективы открываются перед биотехнологами при разработке способов получения и использования иммобилизованных ферментов, искусственно связанных с нерастворимым носителем и при этом сохраняющих свои свойства. Иммобилизованные ферменты в тысячи и десятки тысяч раз стабильнее свободных [1—5]. Все это обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные препараты [6].

При иммунодиагностике возбудителей инфекционных заболеваний наиболее перспективным является иммуноферментный анализ (ИФА).

Однако данный метод характеризуется непродолжительным сроком годности иммуноферментного конъюгата (6—12 мес при надлежащем хранении в холодильнике).

Чувствительность и специфичность ИФА обусловлена не только степенью чистоты и активностью используемых ингредиентов, но и свойствами твердой фазы, которая должна сохранять иммунологические характеристики антител и стабильность фермента в иммобилизованном состоянии, обладать максимальной активностью в отношении связывания компонентов анализируемой системы и быть удобной при разделении фаз в процессе ИФА [7].

Геогджаян Анна Самвеловна, Жарникова Ирина Викторовна, Жарникова Татьяна Владимировна, Ефременко Дмитрий Витальевич, Михайлова Марина Евгеньевна.

*Список сокращений:* БСА — бычий сывороточный альбумин; ИФА — иммуноферментный анализ; КББ — карбонат-бикарбонатный буфер; м.к. — микробные клетки; ОП — оптическая плотность; ПАВ — поверхностно-активные вещества; РА — реакция агглютинации; ФСБ — фосфатно-солевой буфер.

\* Автор для переписки.

Целью исследований явилась иммобилизация фермента пероксидазы хрена с использованием эффективных носителей — липосом и алюмосиликата — при создании стабильного и специфичного диагностикума для выявления туляремии и лептоспироза.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

При выделении иммуноглобулинов использовали групповую агглютинирующую лептоспирозную сыворотку производства ФГУП «Армавирская биофабрика» и диагностическую туляремийную сухую сыворотку для РА производства ФГУЗ «Иркутский государственный научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока». Количественное определение белка проводили на спектрофотометре СФ-26 («ЛОМО», Санкт-Петербург) при длине волны 280 нм.

**Конъюгацию иммуноглобулинов**, фракционированных каприловой кислотой [8], с ферментом пероксидазой хрена (Sigma, США, тип VI-A, Rz =3) проводили после активирования последней методом периодатного окисления по [9]. Для этого к  $(5 \pm 0,1)$  мг пероксидазы хрена добавляли 1 мл 0,3 М раствора натрия кислого углекислого («Росстек Лаб», Россия) и 0,025 мл 0,32%-ного раствора формалина («Росстек Лаб»). Смесь перемешивали на мешалке в течение  $(30 \pm 5)$  мин при температуре  $(22 \pm 4)^\circ$  и добавляли 1 мл раствора периодата натрия (Merck, Германия), продолжая перемешивать в течение еще  $(30 \pm 5)$  мин при температуре  $(22 \pm 4)^\circ$ . Далее вносили 1,0 мл 0,16 М раствора этиленгликоля (для снижения поверхностного натяжения, Sigma, США) и осторожно перемешивали в течение  $(60 \pm 5)$  мин при температуре  $(22 \pm 4)^\circ$ . Активированную пероксидазу хрена считали пригодной для дальнейшей работы, если раствор полученного препарата был прозрачным, без запаха зеленовато-коричневой окраски. Препарат активированной пероксидазы диализовали против 1 л 0,01 М раствора карбонат-бикарбонатного буфера (КББ, соли марки ч.д.а, Россия), рН  $9,55 \pm 0,05$ , в течение  $(19 \pm 1)$  ч при постоянном перемешивании и температуре  $2-8^\circ$  в холодильнике. Далее фермент использовали при конструировании иммобилизованных липосомных и алюмосиликатных иммунопероксидазных конъюгатов.

**Очистку иммунопероксидазных конъюгатов** от несвязавшихся иммуноглобулинов и фермента проводили на хроматографической колонке фирмы LKB (Швеция), используя сефадекс G-100 (Pharmacia, Швеция). Лиофилизацию препаратов

осуществляли в камере LZ-9.2 (Frigeria, Чехия) под вакуумом.

При контроле **активности и специфичности иммуноферментных туляремийных конъюгатов** в качестве гомологичных штаммов использовали следующие: *Francisella tularensis* Miura, *F. tularensis* 890-Аз, *F. tularensis* Schu, *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В качестве гетерологичных штаммов применяли *Brucella abortus* 544, *B. abortus* 19-ВА, *B. melitensis* 16 М, *B. melitensis* 62/9, *B. suis* 1330, *B. suis* 6, *Yersinia pseudotuberculosis* I, II сероварианты, *Escherichia coli* 0-10, *E. coli* 0-18.

При контроле **активности и специфичности иммуноферментных лептоспирозных конъюгатов** в качестве гомологичных штаммов использовали *Leptospira sejroe* 3705, *L. pomona pomona*, *L. canicola* Hond Utrecht IV, *L. tarassovi* LT-82, *L. grippotyphosa* Moskva V и *L. icterohaemorrhagiae* M-20 L. В качестве гетерологичных штаммов применяли: *L. biflexa patoc* Patoc I (штамм-сапрофит), *L. biflexa doberdo* RPE (штамм-сапрофит), *Listeria monocytogenes* 1—7 серотипа, *Y. pseudotuberculosis* I, II сероварианты, *E. coli* 0-10, *F. tularensis* Miura и *B. abortus* 19-ВА. Перечисленные культуры получены из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва.

**Для иммобилизации ферментов** использовали липосомы со средним размером 100 нм, полученные методом «выпаривания в обращенной фазе» из фосфолипидов, выделенных из головного мозга свиней (в возрасте 8—12 мес, порода «крупная белая») [10], и алюмосиликат («Нева Реактив», Россия), представляющий собой тонкодисперсный порошок, содержащий двуокись кремния и двуокись алюминия (насыпная плотность —  $320 \text{ кг/м}^3$ ).

**При получении липосом** использовали метод, описанный в [10], одним из важнейших этапов которого является выпаривание экстракта липидов на роторном испарителе для удаления азеотропной смеси и образования пленки липидов на стенках колбы. Такая пленка должна быть достаточно тонкой, иначе происходит нежелательное включение значительного количества сухого фосфолипида в систему концентрических бислоев, так как замкнутые мембраны будут эффективно предотвращать дальнейший доступ воды и соли. В результате получали большие однослойные везикулы размером 100 нм с примесью мультисамеллярных липосом (около 20%).

**Чувствительность и специфичность конъюгатов** определяли по методике М. Clark в «сандвич»-варианте ИФА [11]. В работе использовали полистироловые планшеты для иммунологических реакций производства Красноярского завода.

Планшеты сенсibilизировали лептоспирозными или туляремиными иммуноглобулинами в концентрации 100 мкг/мл в объеме 0,1 мл КББ, рН (9,55±0,05) и инкубировали 3 ч при температуре 37°. Несорбированные иммуноглобулины удаляли, в лунки вносили по 0,1 мл взвеси лептоспирозного (туляреминого) антигена с концентрацией 5·10<sup>8</sup> м.к./мл, титровали и инкубировали 1 ч при температуре 37°. Несвязавшиеся антигены удаляли, планшеты промывали двукратно 0,05%-ным раствором твин-20 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и просушивали. Затем вносили по 0,1 мл разведенного (от 1:200 до 1:600) иммобилизованного иммунопероксидазного конъюгата и инкубировали 1 ч при температуре 37°. После промывки добавляли по 0,1 мл свежеприготовленного субстрат-индикаторного раствора (0,1 М раствор лимонной кислоты («Нева Реактив») с 0,2 М раствором натрия фосфорнокислого однозамещенного («Нева Реактив»)), рН 5,0, в присутствии 0,006 % перекиси водорода («ПроХим», Россия) и ортофенилендиамина (Sigma, США) в концентрации 0,4 мг/л) и инкубировали 5 мин при температуре (22±4)° без доступа света. Для остановки реакции использовали 4 н. раствор серной кислоты.

Визуальный учет результатов проводили по окраске в опытных и контрольных образцах: в опыте окраска была оранжевой, в отрицательном контроле — раствор был прозрачный. Инструментальный учет результатов проводили путем определения ОП при длине волны 492 нм проб, находящихся в лунках планшета (фотометр Multiskan FC (Финляндия)). Результаты считали положительными, если ОП исследуемого образца в 2 и более раз превосходила среднее значение ОП отрицательных контролей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Технология получения иммобилизованного иммунопероксидазного конъюгата состояла из нескольких этапов: активация пероксидазы хрена; включение фермента в липосомы (или иммобилизация на алюмосиликате); иммобилизация полученных препаратов с иммуноглобулинами; очистка от несвязавшихся компонентов, лиофилизация и контроль.

В качестве носителя необходимо было выбрать такой, который бы не препятствовал проникновению к нему субстрата и не лишал фермент подвижности, необходимой для выполнения присущей ему функции. Иммобилизованный в липосомах материал оказывается защищенным липидной мембраной от действия неблагоприятных факторов внешней среды, благодаря чему увеличива-

ется срок его годности [12]. Принимая во внимание вышеперечисленные факторы и учитывая свойства ряда носителей, мы пришли к выводу, что наиболее подходящими носителями для пероксидазы хрена в рамках поставленной задачи являются липосомы и алюмосиликат, так как они обладают контролируемыми характеристиками — составом, размером и поверхностными свойствами. Кроме того, они нетоксичны, не инактивируют фермент (неприведенные данные авторов), позволяя ему функционировать с высокой активностью.

Далее необходимо было подобрать метод иммобилизации с учетом его влияния на активность фермента. Известно, что пероксидаза способна выполнять роль специфического катализатора при соблюдении двух основных условий: абсолютно правильная конформация и возможность изменять ее в процессе катализа.

При получении **липосомно-иммунопероксидазного конъюгата** использовали различные методы включения фермента в липосомы. Применяли обработку неактивированного фермента с помощью ультразвука, процесс замораживания—оттаивания, использование различных концентраций активирующих компонентов (глутарового альдегида, ПАВ и т.д.) с последующей иммобилизацией антител (иммуноглобулины туляреминые и лептоспирозные). Но результаты оказались неудовлетворительными по чувствительности. В связи с этим мы в дальнейшем активировали фермент методом периодатного окисления, что приводило к образованию альдегидных групп в углеводной части фермента пероксидазы хрена [9].

Получение комплекса липосома—фермент—иммуноглобулины (конъюгат) проводили следующим образом: к 5 мг окисленной периодатным методом пероксидазы добавляли 1 мл суспензии липосом в 0,01 М КББ, рН 9,5. Суспензию подвергали в течение 1 мин ультразвуковой обработке на дезинтеграторе УЗДН-2Т (Сумы, Украина), обеспечивающей эффективный контакт поверхности липидной мембраны липосом с ферментом (1 мин при 22 кГц), после чего смесь инкубировали при температуре (22±4)° в течение 2 ч. Ковалентное связывание липосом с ферментом, вероятно, осуществлялось при взаимодействии части активированных групп пероксидазы и аминокрупп, присутствующих в молекулах ганглиозидов, встроенных в мембрану липосом при их приготовлении.

Несвязавшуюся пероксидазу удаляли хроматографически, используя колонку сефадекса G-100 (100×12 мм), уравновешенную 0,01 М КББ, рН 9,5. В первом пике содержались активированные ферментом липосомы (элюция 0,01 М КББ),

во втором — несвязавшийся фермент. Фракции первого пика объединяли и добавляли к ним лептоспирозные и туляремиальные иммуноглобулины (Ig G) в количестве от 2 до 10 мг/мл.

Фиксацию иммуноглобулинов на поверхности липосом с присоединенной пероксидазой хрена проводили при температуре  $(22\pm 4)^\circ$  при перемешивании в течение 1—24 ч; препарат стабилизировали 5 мг боргидрида при температуре  $(4—6)^\circ$ . При этом иммуноглобулины за счет свободных аминок групп связывались с оставшимися свободными альдегидными группами углеводной части пероксидазы [9].

Для очистки конъюгата от несвязавшихся иммуноглобулинов использовали гель-хроматографию. Конъюгат наносили на колонку сефадекса G-100 (100×12 мм), уравновешенную ФСБ в концентрации 0,1 моль/л, pH  $7,2\pm 0,1$ . Элюцию проводили тем же буферным раствором, собирали фракции по 2,0 мл и исследовали поглощение каждой фракции на спектрофотометре при двух длинах волн — 280 и 403 нм. В результате происходило фракционирование исходной смеси молекул на зоны в зависимости от размеров; поэтому в первом пике (свободный объем колонки) выходил конъюгат, далее несвязавшиеся иммуноглобулины. Фракции, имеющие отношение  $A_{403}/A_{280}$ , равное 0,4—0,5, объединяли, и к готовому препарату добавляли до 1 % БСА.

Для увеличения срока годности препарат помещали в ампулы, замораживали и лиофилизовали в течение  $18\pm 2$  ч до конечной температуры  $(25\pm 1)^\circ$ . В готовом препарате и в процессе хранения в течение 5 лет контролировали физико-химические (растворимость, цветность, прозрачность, потерю в массе при высушивании) и иммунологические (активность, специфичность, чувствительность) свойства. Чувствительность и специфичность конъюгата определяли в ИФА с гомологичными и гетерологичными штаммами.

Схема получения липосомно-иммунопероксидазного конъюгата представлена на рисунке.

В результате проведенных экспериментов установлено, что обязательным условием получения качественного конъюгата пероксидазы хрена с липосомами является активирование фермента периодатным методом; концентрация белка иммуноглобулинов при иммобилизации должна составлять 5 мг/мл, а время их инкубации с липосомным ферментным конъюгатом — 2 ч.

При получении **алюмосиликатно-иммунопероксидазного конъюгата** первоначально проводили активирование алюмосиликатного носителя методом окисления с использованием перхлората натрия: к 1 г алюмосиликатного носителя добавляли 7,5 мл дистиллированной воды, содержащей 0,25 г натрия перхлората. Смесь инкубировали при температуре  $(22\pm 4)^\circ$  в течение 1 ч в темноте, затем сорбент отмывали дистиллированной водой. К 0,5 мл 10%-ной взвеси активированного алюмосиликатного носителя добавляли 0,5 мл иммуноглобулинов с концентрацией белка 5 мг/мл и инкубировали в течение 2—4 ч. Происходило взаимодействие альдегидных групп активированного алюмосиликатного носителя с аминок группами белка. Далее иммуноглобулины, иммобилизованные на алюмосиликате, объединяли с 0,6 мл раствора активированной пероксидазы хрена и выдерживали в течение 2—4 ч. При этом иммуноглобулины за счет свободных аминок групп связывались с альдегидными группами углеводной части пероксидазы. Для стабилизации вносили 2 мг натрия боргидрида и смесь инкубировали 2 ч, а затем диализовали ее против 0,1 М ФСБ, pH 7,2 в течение 12—14 ч.

Полученные препараты помещали в ампулы, замораживали и лиофилизовали в течение  $18\pm 2$  ч до достижения температуры  $(25\pm 1)^\circ$ .

Физико-химические и иммунологические свойства иммобилизованных на алюмосиликате препаратов контролировали в течение 3 лет.

В табл. 1 представлены результаты анализа физико-химических свойств и чувствительности липосомного препарата в отношении туляремиального микроба.

Аналогичные результаты получены и с алюмосиликатным иммунопероксидасным конъюгатом при хранении в течение трех лет (срок наблюдения). Таким образом, стабильность разработанных препаратов превосходила аналогичный показатель традиционных иммуноферментных конъюгатов, срок годности которых не превышал 1 года.

На основе полученных иммобилизованных иммунопероксидазных конъюгатов составлены диагностические тест-системы для определения туляремии и лептоспироза в ИФА: иммуноглобулины туляремиальные (лептоспирозные) — 1 ампула (0,25 мл); взвесь туляремиального микроба (взвесь лептоспирозного микроба) — 1 ампула (1 мл); туляремиальный (лептоспирозный) липосомный иммунопероксидазный конъюгат (активность\* 1:400),

\* Максимальное разведение конъюгата, при котором выявляется минимальная отличная от фона концентрация микробной взвеси.

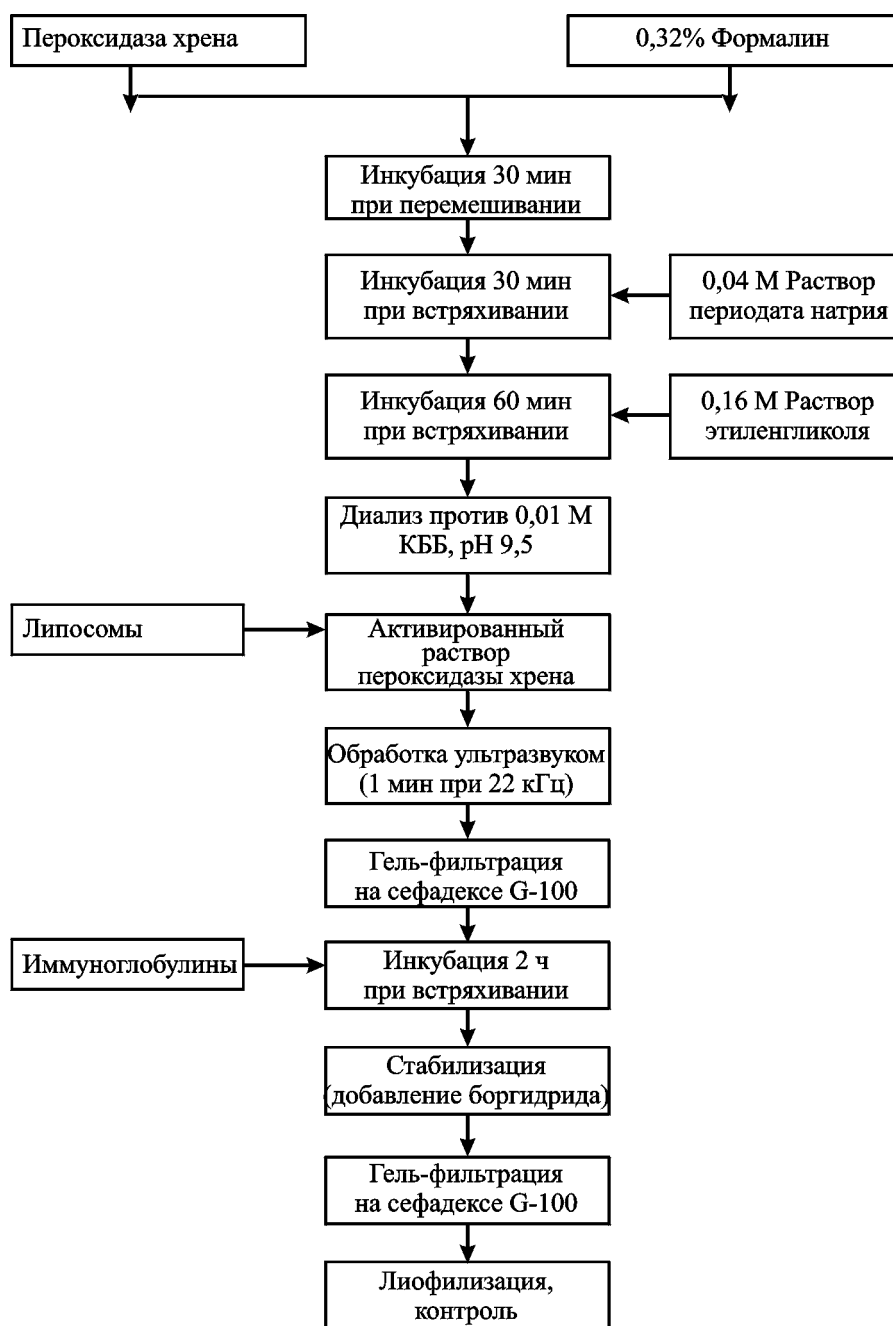


Схема получения липосомно-иммунопероксидазного конъюгата

1 ампула (0,1 мл); необходимые ингредиенты для постановки ИФА (ФСБ, БСА, твин-20, стоп-реагент (4 н. раствор серной кислоты) — по 1 флакону, орто-фенилендиамин — 2 флакона и гидроперит — 1 таблетка).

Рабочий титр, специфичность, чувствительность тест-систем определяли по методике в «сэндвич»-варианте ИФА[11]. Результаты реакции учитывали визуально и на фотометре.

Чувствительность иммунопероксидазных конъюгатов составила  $5 \cdot 10^4$ — $1 \cdot 10^5$  м.к./мл при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами, что свидетельствовало об их высокой специфичности (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенных исследований изготовлены высокоактивные (до 1:600) специфичные (отсутствуют перекрестные реакции с гетерологичными штаммами) иммоби-

Таблица 1

**Стабильность лиофилизованного туляремийного липосомно-иммунопероксидазного конъюгата в процессе хранения**

Серия препарата	Потеря в массе при высушивании, %	Срок наблюдения					
		1 год		2 года		5 лет	
		Растворимость в воде и внешний вид	Чувствительность, м.к./мл	Растворимость в воде и внешний вид	Чувствительность, м.к./мл	Растворимость в воде и внешний вид	Чувствительность, м.к./мл
1	2,6	1 мин; суспензия белого цвета	$1 \cdot 10^5$	1 мин; суспензия белого цвета	$1 \cdot 10^5$	1 мин; суспензия белого цвета	$1 \cdot 10^5$
2	2,6	1 мин; суспензия белого цвета	$5 \cdot 10^4$	1 мин; суспензия белого цвета	$5 \cdot 10^4$	1 мин; суспензия белого цвета	$5 \cdot 10^4$

Таблица 2

**Чувствительность и специфичность иммобилизованных иммунопероксидазных конъюгатов в ИФА**

№	Наименование штаммов микроорганизмов	Конъюгаты	
		Липосомно-иммунопероксидазный	Алюмосиликатно-иммунопероксидазный
		Чувствительность, м.к./мл	
<i>Туляремийный</i>			
1	<i>F. tularensis</i> Schu	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$
2	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
3	<i>F. tularensis</i> 890-Аз	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
4	<i>F. tularensis</i> Miura	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
5—10	<i>B. abortus</i> 19 ВА, <i>B. abortus</i> 544, <i>Y. pseudotuberculosis</i> , I, II сероварианты, <i>E. coli</i> 0-10, 0-18	—*	—
<i>Лептоспирозный</i>			
11, 12	<i>L. sejroe</i> 3705, <i>L. pomona pomona</i>	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
13, 14	<i>L. canicola</i> Hond Utrecht IV, <i>L. tarassovi</i> LT-82	$1 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$
15	<i>L. grippityphosa</i> Moskva V	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$
16	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> M-20 L	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
17, 18	<i>L. biflexa patoc</i> Patoc I, <i>L. biflexa doberdo</i> RPE	—	—
19—30	<i>Y. pseudotuberculosis</i> , I, II сероварианты, <i>L. monocytogenes</i> 1-7, <i>B. abortus</i> 19-ВА, <i>F. tularensis</i> Schu, <i>E. coli</i> 0-10	—	—

\* (—) — отсутствие реакции.

лизованные иммунопероксидазные конъюгаты, позволяющие выявлять с помощью ИФА возбудителей лептоспироза (туляремии) в концентрации  $5 \cdot 10^4$ — $1 \cdot 10^5$  м.к./мл. Препараты были стабильны в течение срока наблюдения в пять лет (липосомные) и трех лет (алюмосиликатные).

Получено 31.01.11

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1982. — С. 92.
2. Тривен М. Иммуобилизованные ферменты. — М.: Мир, 1983. — С. 23.
3. Абелян В.А. Иммуобилизация циклодекстрингликозилтрансферазы и характеристика полученного биокатализатора / В.А. Абелян, Э.Г. Африкян // Журн. прикл. биохим. микробиол. — 1992. — Т. 28. — № 2. — С. 205—209.
4. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений. — 3-е изд., стер. — М.: Издательский центр «Академия», 2006. — С. 28.
5. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. — 2-е изд. [под ред. А.В. Катлинского]. — М.: Издательский центр «Академия», 2007. — С. 30—38.
6. Биологическая химия [под ред. Н.И. Ковалевской]. — М.: АCADEMA, 2005. — 255 с.
7. Дмитриев Г.А. Применение ИФА для серодиагностики сифилиса / Г.А. Дмитриев, Т.А. Киселева // Актуальные вопросы дерм. и венер.: Сб. тр. юбил. конф., посвящ. 5-летию созд. кож. и вен. болезней педиатр. фак. РГМУ. — М.: РГМУ, 1997. — С. 36—37.
8. Steibuch, G. The isolation of IgG from imanalion serra with the acid of caprilic / G. Steibuch, R. Andran // Arch. Biochem. Stray Biophys. — 1969. — V. 139. — P. 279—284.
9. Nakane, P.K. Peroxidase-labelled antibody-a new method of conjugation / P.K. Nakane, A. Kawaoi // J. Histochem. Cytocem. — 1974. — V. 22. — N. 4. — P. 506—508; 1084—1091.
10. Ефременко В.И. Липосомы. Монография. — Ставрополь, 1999. — 236 с.
11. Clark, M.F. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus / M.F. Clark, A.N. Adams // J. Gen. Viro. — 1977. — V. 36. — N. 3. — P. 475—483.
12. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. — М.: Наука, 1986. — 240 с.

A.S. GEOGDZHAYAN, I.V. ZHARNIKOVA,  
T.V. ZHARNIKOVA, D.V. EFREMENKO,  
and M.E. MIKHAILOVA

The Stavropol Research Antiplateau Institute, 355106,  
Stavropol Russia

e-mail: IVJ-biotech@yandex.ru

#### Immobilized Enzymes and their use for Production of Diagnostic Test Systems for Causative Agents of Infectious Diseases

Optimum conditions for obtaining of highly stable specific (not participating in cross-reactions) immobilized immunoperoxidase conjugates using liposomes and aluminosilicate as carriers have been determined. The promising character of immobilization on the carriers of the enzymes and immunoglobulins was shown. The immunoperoxidase conjugates were tested in enzyme immunoassay of homo- and heterologous strains of the tularemia and leptospirosis causative agents. The shelf life equal to the observation time of the developed preparations was prolonged up to 5 years for the liposomal immunoperoxidase conjugates and up to 3 years for the aluminosilicate conjugates that is considerably longer than the shelf life of the traditional immunoperoxidase conjugates (1 year). The immobilized preparations remained highly sensitive and specific.

*Key words:* activity, aluminosilicate, enzyme, immobilized immunoperoxidase conjugates, immunoglobulins, liposomes, specificity.

---

\* Author for correspondence.