

Контрольные материалы, применяемые при серодиагностике сифилиса: виды, способы обеспечения стабильности

С.В. Ротанов, Н.В. Фриго, Т.Е. Манукьян

Control materials used for diagnostics of syphilis: types and methods for ensuring stability

S.V. ROTANOV, N.V. FRIGO, T.YE. MANUKIYAN

об авторах:

С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Н.В. Фриго — д.м.н., главный научный сотрудник, заведующий отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Т.Е. Манукьян — научный сотрудник ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Приведены данные литературы о видах контрольных материалов, применяемых при серодиагностике сифилиса, рассмотрены проблемы, связанные с разработкой контрольных материалов, содержащих и не содержащих антитела к возбудителю сифилитической инфекции, на основе матрицы сыворотки крови человека. Обоснованы преимущества использования жидких нативных контрольных материалов в сравнении с аналогами, приготовленными в лиофильной форме. Оценивается влияние комплекса факторов физической и химической природы на сохранение специфической активности белковых структур в образцах сыворотки крови человека, сохраняемых в нативной и лиофилизованной формах. Обсуждаются возможности использования различных стабилизаторов, позволяющих длительно сохранять специфическую активность антител, входящих в состав контрольных материалов.

Ключевые слова: сифилис, контрольные материалы, консервирующие и стабилизирующие добавки, условия хранения.

The authors present data about the types of control materials used for diagnostics of serological syphilis, examine problems related to the development of control materials with or without anti-syphilis pathogen antibodies on the basis of the human blood serum.

The authors substantiate the advantages of using liquid native control materials as compared to their lyophilic analogs. The article evaluates the effect of a body of physical and chemical factors on the preservation of the specific activity of protein structures in human blood serum samples stored in the native and lyophilic forms. The possibility to use different stabilizers for long-term preservation of the specific activity of antibodies forming a part of control materials is discussed.

Key words: syphilis, control materials, preservatives and stabilizers, storage conditions.

■ Качество проведения клинических лабораторных исследований играет важную роль при диагностике заболеваний человека [1—3] и приобретает особое значение в случаях диагностики социально значимых заболеваний, к которым относится сифилитическая инфекция.

При обследовании с целью установлении диагноза «сифилис» определяющую роль играют результаты

непрямых (серологических) тестов, принцип проведения которых основан на выявлении антител к антигенам возбудителя заболевания — *T. pallidum* [4—6]. Важным условием обеспечения достоверности этих исследований является проведение внутрилабораторного контроля качества с использованием контрольных материалов, позволяющих по совокупности признаков оценивать качество проведения лабораторного

теста и приемлемость данных, полученных в каждой аналитической серии [7—10].

В Российской Федерации в качестве контрольных материалов, предназначенных для осуществления контроля качества серологических исследований при диагностике сифилиса, длительное время выпускали лиофилизированные сыворотки крови с различным уровнем антитрепонемных антител, полученные от здоровых и зараженных сифилисом лабораторных животных (кроликов) [11, 12]. Однако в ряде современных методов лабораторных исследований для диагностики сифилиса применяются технологии, основанные на использовании видоспецифических конъюгатов, вступающих во взаимодействие с антителами человека, что исключает использование кроличьих сывороток в качестве адекватных контрольных материалов. Другие контрольные материалы для серодиагностики сифилиса в Российской Федерации до последнего времени не производились.

На практике во многих лабораториях дерматовенерологических учреждений при проведении серологических исследований на сифилис используют так называемые «сливные» сыворотки — пул образцов, полученных путем объединения сывороток крови человека, ранее исследованных в различных серологических реакциях. Для обеспечения длительного хранения этих сывороток крови применяют сухую борную кислоту (0,02 г на 1 мл), метилмертиолят (в разведении 1:10 000) или замораживание (при -18 — -20 °C) [11—14]. Однако такие контрольные сыворотки не являются общепризнанными контрольными материалами и не могут быть рекомендованы к применению в клинико-диагностических лабораториях в качестве стандартных контрольных материалов.

В ряде работ [15—16] встречаются сведения о производстве на отечественных предприятиях ЗАО «Вектор-Бест» и ЗАО «Медико-биологический союз» лиофилизированных сывороток крови, предназначенных для оценки качества работы лабораторий и тест-систем для диагностики сифилиса, однако указанные материалы до последнего времени не были разрешены к применению в учреждениях здравоохранения Российской Федерации.

В настоящей статье представлен обзор современных контрольных материалов, применяемых при серодиагностике сифилиса и других социально значимых инфекций, а также подходов к обеспечению их стабильности.

Разработка и производство стандартов, калибраторов и контрольных материалов для клинических лабораторных исследований является важным разделом деятельности крупных производственных предприятий и научно-исследовательских центров. Требования и рекомендации по производству, аттестации и внедрению международных биологических стандартов содержатся в нормативных документах, регулярно вы-

пускаемых Комитетом по стандартизации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [17, 18]. В Российской Федерации такие нормативные требования были разработаны по отношению к национальным стандартным образцам медицинских иммунобиологических препаратов, которые используются в качестве стандартизованных средств измерения на этапах промышленного производства диагностических наборов реагентов [19].

В зависимости от назначения контрольные материалы биологического происхождения могут выпускаться в виде стандартов, представленных ограниченным количеством невозобновляемых доз-аликвот, или в виде панелей контрольных сывороток, регулярно выпускаемых промышленным способом [17, 18].

Иммунобиологический стандарт, приготовленный на основе сыворотки крови человека, представляет собой образец контрольной сыворотки, обладающий количественно охарактеризованной и выраженной в международных единицах активностью, выявляемой определенным методом [18]. Примером такого стандарта является «Первый международный стандарт сыворотки крови человека, содержащей антитрепонемные антитела», разработанный ВОЗ в 1958 г., владельцем и распространителем которого является Национальный институт биологических стандартов и контроля Великобритании (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) [19]. Примером международного стандарта является также стандарт Фурнье для РПГА, латексных тестов и VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory), производимый фирмой «La Technique Biologique» при Институте Пастера (Франция), применяемый для оценки чувствительности тест-систем для диагностики сифилиса полуколичественными методами [20].

Для оценки клинической эффективности новых методов исследования, качества производственных серий диагностических наборов реагентов, проведения внутрилабораторного контроля качества отдельные контрольные материалы могут быть объединены в панели контрольных материалов. Выделяют следующие основные типы панелей контрольных материалов [21—22]:

- экспертные панели — включают естественные неразведенные образцы сыворотки крови, содержащие определенный маркер, полностью охарактеризованные методами, официально разрешенными к применению с использованием сертифицированных тест-систем; предназначены для определения аналитической чувствительности метода при регулярной внутрилабораторной и внешней оценке качества исследований;
- квалификационные панели — состоят из сывороток с разным сочетанием антител к возбудителю заболевания, которые редко встречаются при рутинном тестировании; их используют для тренинга,

проверки качества работы персонала, выявления систематических ошибок и неисправностей приборов;

- верификационные панели — состоят из нативных неразведенных сывороточных образцов с разным уровнем антител к возбудителю заболевания; предназначены для оценки точности выполнения исследований, определения доверительного интервала при валидации и оценке качества коммерческих наборов реагентов;
- панели чувствительности — содержат несколько последовательно разведенных образцов, калиброванных относительно международных стандартов; предназначены для оценки аналитической чувствительности тестов;
- сероконверсионные панели — редкие серии образцов сыворотки, последовательно полученных от одного больного в процессе развития у него заболевания; такие панели характеризуют динамику содержания изучаемого маркера.

В соответствии с международными рекомендациями при разработке контрольных материалов в настоящее время отдают предпочтение неразведенным сывороткам крови человека в жидком (нативном) виде, так как они по своим биологическим свойствам наиболее приближены к образцам, с которыми проводят диагностические исследования в клинических лабораториях [23—25].

Таким образом, в качестве исходного сырья при производстве контрольных материалов для диагностики сифилитической инфекции, как правило, используют неразведенные образцы сыворотки крови [9, 24, 26, 27], а также дефибринированную плазму крови [28], полученную от больных с клинически установленным диагнозом сифилиса, показавшие положительные результаты при их исследовании на сифилис. При этом степень активности содержащихся в контрольных материалах антител должна находиться в области значений, определяющих принятие диагностического решения [9, 29].

Необходимым условием создания биологических стандартов и контрольных материалов является обеспечение их стабильности — способности сохранять свои специфические характеристики (уровень активности антител) при их хранении в течение длительного времени (не менее 1—2 лет) [17—18, 23, 30].

На стабильность контрольных материалов оказывает влияние качество сырьевых материалов для их производства. При получении контрольных материалов необходимо соблюдение ряда требований, направленных на сохранение исходной специфической активности, гомогенности и других физико-химических и биологических свойств сырьевого продукта [17, 23, 30]. Сырьевые материалы в процессе их производственной обработки должны сохраняться в контролируемых условиях, предотвращающих возможное

негативное влияние на их активность ферментов, кислорода воздуха, света и изменений температурного режима хранения [23]. Неблагоприятное воздействие на конформационную структуру белковых молекул сыворотки крови могут оказывать даже рутинные технологические процедуры, такие как прокачивание плунжерным насосом [31] или резкое встряхивание [12].

Известно несколько методологических приемов, позволяющих обеспечить длительное сохранение специфической активности антител в нативных образцах сывороточного материала (стабильность); они предполагают использование дополнительных факторов физического или химического воздействия (лиофильное высушивание, внесение консервирующих и стабилизирующих добавок, стерилизующая фильтрация, замораживание и др.) [12, 17, 26, 28, 32—36].

Среди факторов физической природы в первую очередь необходимо отметить стабилизирующее влияние низкой температуры. Сыворотки крови могут длительное время сохранять свою активность при температуре 2—10 °С в случае их стерильности (или при добавлении антимикробных препаратов). Многими исследователями отмечено резкое замедление динамики деградации белковых структур при быстром замораживании растворов белков и их последующем хранении в условиях низкой температуры [17, 31, 37]. Данный подход применялся на практике. Известный мировой производитель контрольных материалов американская фирма «Boston Biomedica Inc» при создании контрольных материалов для реактивов тестов на сифилис использовала замораживание и хранение сывороток крови при –20 °С.

Замораживание сывороток являлось единственным и достаточным условием обеспечения стабильности при создании референсной панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1, которую ранее выпускал ФГУН «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Роспотребнадзора (Россия). В данной панели образцы сыворотки крови без дополнительной обработки разливали в пробирки по 10 и 20 мкл и хранили при –20 °С. Эта панель имела статус отраслевого стандартного образца, срок ее годности составлял один год [38].

Более глубокое замораживание контрольных материалов, например при –70 °С, обеспечивает значительно более надежный и воспроизводимый результат сохранения специфической активности антител в контрольных сыворотках [17, 31], что широко применялось при хранении сывороточных образцов в крупных исследовательских центрах, таких как CDC (г. Атланта, США).

Однако указанный подход малоприменим для практического использования в клинических лабораториях учреждений здравоохранения. Условия доставки готовой продукции от производителя к потребителю не позволяют поддерживать во всех звеньях «холодовой транспортной цепи» температурный режим

(–70—80 °C), необходимый для сохранения исходной активности контрольных материалов.

Разработка технологии лиофильного высушивания явилась одним из научных достижений XX века, которое широко использовалось для длительного (2—5 лет и более) хранения таких медицинских иммунобиологических препаратов, как вакцины, сыворотки (лечебные и диагностические), антибиотики, штаммы микроорганизмов и др. Однако контрольные материалы в лиофилизированной форме, несмотря на удобство транспортировки и хранения, имели некоторые ограничения при их последующем использовании. При лиофилизации сыворотка крови подвергалась сложной технологической обработке и обезвоживанию, в процессе которых происходили частично необратимые изменения пространственной конформационной структуры белка, сопряженные с формированием стабильных олиго- и мономерных изоформ или ковалентных агрегатов, существенно отличавшихся от исходной нативной формы [39—41]. Даже при однократном замораживании часть анти-трепонемных антител денатурирует, и становятся очевидными ограничения по использованию лиофилизированных контрольных материалов для контроля методов серодиагностики сифилиса [42]. Кроме того, при работе с лиофилизированными контрольными материалами высока вероятность ошибок, связанных с потерей массы препарата в процессе высушивания и/или при неаккуратном открывании флаконов, а также при восстановлении их в жидкой форме (погрешности дозирования растворителя, несоблюдение времени, необходимого для конформационных изменений и стабилизации белков в растворе, качество перемешивания) [25, 43]. Каждый из названных факторов может приводить к тому, что пробы контрольных материалов, полученные из одного и того же флакона или флаконов одной серии, существенно отличаются по содержанию в них иммунных антител от указанных производителем контрольных материалов [25, 43]. Кроме этого, контрольные материалы, полученные из лиофилизированных сывороток, обладают повышенной мутностью или опалесценцией [40, 44], что является дополнительным ограничением их применения в ряде серологических тестов [29, 32, 44].

В соответствии с международными рекомендациями [17—18], оптимальной комплектацией иммунобиологических контрольных материалов для проведения лабораторных исследований являются панели контрольных сывороток, включающие образцы, содержащие и не содержащие антитела к изучаемому патогену. При этом производство контрольных материалов из сыворотки крови человека в жидкой нативной форме исключает появление погрешностей измерения, обусловленных подготовительными процедурами при восстановлении лиофилизированных контрольных сывороток.

Возможным методологическим подходом к решению проблемы сохранения специфической активности иммунных антител в контрольных материалах, полученных на основе матрицы сыворотки крови человека, является использование высокомолекулярных природных или синтетических соединений и поверхностно-активных веществ, которые за счет электростатической гидрофобной природы связываются с молекулами иммуноглобулинов посредством нековалентных связей, образуя стабильные комплексы.

Используемые в качестве консервантов химические реагенты не должны влиять на специфическую активность сывороток и препятствовать проведению исследования. Так, компания Profile Diagnostics (США) при разработке жидких контрольных сывороточных панелей для серодиагностики сифилиса использовала 0,1% раствор азиды натрия (неорганическое вещество с формулой NaN_3 , характеризующееся высокой растворимостью в воде и используемое в медицине как консервант) [45]. Однако этот реагент в указанной концентрации нестойк в растворе и обладает ингибирующей активностью в отношении фермента пероксидазы хрена, который входит в состав практически всех наборов реагентов для иммуноферментного анализа [46], что ограничивало практическое применение контрольных материалов данного производителя.

Крупный производитель сывороточных панелей и стандартов фирма «Boston Biomedica Inc.» (США) включала в состав контрольных материалов своих панелей консервант ProClin-300 (смесь двух активных изотиазолонов: 2-метил-4-изотиазолин-3-он и 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он), который при попадании в клетку микроорганизма ингибирует специфические ферменты окислительно-восстановительного цикла Кребса [47], но не влияет на результаты серологического исследования.

Некоторые другие производители препаратов, имеющих в своем составе белковые компоненты, использовали в качестве консервирующего средства Bronidox (5-бром-5-нитро-1,3-диоксан, растворенный в 1,2 пропиленгликоле), обладающий высокой антибактериальной активностью в конечной концентрации 0,1—0,5% [48]. Этот реагент широко применяли при производстве препаратов, используемых в иммунологии и косметологии.

В качестве консервантов также использовались и другие реагенты, например борная кислота и ее соли, различные антибактериальные препараты, мертиолят [11, 26, 49, 50], этиленгликоль [51], этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) [52].

Мертиолят (орто-этил-ртуть-тиосалицилат натрия, органическое соединение ртути ароматического ряда) длительное время широко использовали в качестве консерванта при производстве вакцин и сывороток. Для сохранения активности панелей

контрольных материалов, используемых на различных этапах производственного цикла, мертиолят применяется такими отечественными производителями, как ЗАО «Вектор-Бест» и ЗАО «Медико-биологический союз» [44].

Показано, что внесение в состав длительно сохраняемых образцов сыворотки крови антикоагулянтов, таких как ЭДТА, способствует связыванию ионов тяжелых металлов, являющихся инициаторами перекисных процессов, и сохранению активности белковых структур [52].

При замораживании растворов белков и их последующей лиофилизации в качестве стабилизирующих веществ часто добавляют различные углеводы, сахара или полимеры [49, 53—55]. Исследования К. Imamura и соавт. (2003) показали, что при добавлении дистиллированной воды к лиофилизованному бычьему сывороточному альбумину только в присутствии сахаров (сахарозы, трегалозы или декстранов) наблюдалось полное восстановление нативной пространственной структуры молекул белка — рефолдинг, а в образцах без добавления сахаров этого восстановления не происходило [34]. Самым распространенным стабилизатором углеводного происхождения является сахароза, однако имеются данные, что наилучшими стабилизирующими свойствами обладает другой дисахарид — трегалоза, состоящий из двух остатков D-глюкозы, соединенных α , α -гликозидной связью [55—57].

В других исследованиях также было отмечено положительное влияние сахаров на сохранность белковых структур, присутствующих в растворах препаратов [58], но предпочтение отдавалось ди- и олигосахаридам, так как более крупные углеводы способны образовывать альдегиды [49].

Белки плазмы и сыворотки крови в процессе их длительного хранения в незамороженном виде могут подвергаться деградации за счет присутствия ферментов, обладающих протеолитической активностью [59—61].

Для обеспечения длительного хранения контрольных материалов, обладающих специфической иммунной активностью, необходима разработка стабилизирующих добавок, способных ингибировать протеолитическое воздействие ферментов сыворотки крови. К числу таких стабилизирующих добавок могут быть отнесены ингибиторы протеолитических ферментов — антитрипсина, в частности α_1 -антитрипсин — гликопротеид, который синтезируется в печени и подавляет активность многих протеолитических энзимов: трипсина, химотрипсина, плазмина, тромбина, эластазы, гиалуонидазы, протеаз лейкоцитов [62].

Для предотвращения бактериального обсеменения контрольных материалов широко применяются ингредиенты, обладающие выраженной антибактериальной и антигрибковой активностью. В этих же целях применяется консервирование путем стерилизующей фильтрации и последующего хранения при температуре от 2 до 8 °C [26].

В Американском центре по контролю распространения заболеваний при приготовлении из плазмы крови референсных материалов и контрольных образцов для квалификационного тестирования серологических лабораторий финальная обработка сырьевого материала проводится путем двустадийного фильтрования: сначала через фильтр с порами 0,45 мкм, а затем — 0,22 мкм [24]. Российские производители контрольных материалов с целью удаления бактерий и балластных белков используют фильтры с диаметром пор 0,8 и 0,45 мкм [44].

Таким образом, как следует из приведенного обзора источников литературы, создание современных контрольных материалов, предназначенных для контроля качества серологических исследований для диагностики сифилитической инфекции, должно предусматривать разработку и опытно-экспериментальное обоснование оптимального состава стабилизирующих реагентов и условий хранения контрольных материалов, позволяющих обеспечить сохранность специфической активности антител к возбудителю сифилиса. ■

Литература

1. Меньшиков В.В. Стандартизация в системе мер управления качеством клинических лабораторных исследований. В кн.: Меньшикова В.В. (ред.) Качество клинических лабораторных исследований. Новые горизонты и ориентиры. М., 2002; 11—18.
2. Меньшиков В.В., Кадашева О.Г., Пименов Л.М. и др. Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации «Правила управления качеством клинических лабораторных исследований». Клин. лаб. диагност. 2004; 4: 48—53.
3. Садовой М.А., Бедорева И.Ю. Применение идеологии Международных стандартов ИСО серии 9000 в создании Системы управления качеством медицинской помощи. Мед. право 2008; 1 (www.openworld.gov/uploads/33221cff2f33a5919f959c48cafe280d.doc).
4. Young H. Guidelines for serologic testing for syphilis. Sex Transm Inf 2000; 76: 403—405.
5. Berg A.O., Allan J.D., Frame P. et al. Screening for syphilis infection: recommendation statement. Annals of Family medicine 2004; 2 (4): 362—365.
6. Sokolovskiy E., Frigo N., Rotanov S. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of syphilis in East-European countries. J of the Eur Acad of Dermatol and Venereol 2009; 23 (6): 623—632.
7. Заикин Е.В. Стандартизация процедур и требования при проведении контроля качества в медицинских лабораториях. Пробл. стандартизации в здравоохран. 2004; 11: 74.
8. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Формирование единого технологического процесса производства лабораторных анализов. Опыт Медицинского центра ЦБ РФ. Клин. лаб. диагност. 2001; 5: 45—49.

9. Приказ Минздрава РФ № 45 от 7 февраля 2000 года «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
10. Приказ Минздрава РФ № 220 от 26 мая 2003 года «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов (ОСТ 91500.13.0001-2003)».
11. Приказ Минздрава Российской Федерации № 87 от 26 марта 2001 года «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса». Приложение 1. «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис».
12. Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. М: Медицина. 1987.
13. Циркулярное письмо министра здравоохранения РФСФР по серологии от 14.10.58 г. Инструкция 1. «О порядке контроля за качеством серологических исследований». В кн.: Туранова Н.М. (ред.) Методические материалы (в дополнение в справочнику по организации борьбы с венерическими и заразными кожными болезнями. Медгиз, 1957). М: Медгиз, 1960: 152—144.
14. Циркулярное письмо № 55-757 от 18.10.58 г. Министерства здравоохранения РСФСР о контроле за качеством серологических реакций. Приложение 1. «Инструкция о порядке контроля за качеством серологических исследований». В кн.: Туранова Н.М. и Студиница А.А. (ред.) Справочник по организации борьбы с венерическими и заразными кожными заболеваниями. М: Медгиз, 1961: 141—144.
15. Дмитриев Г.А. Состояние лабораторной диагностики сифилиса. *Consilium medicum* 2004; 6 (3): 211—215.
16. Препараты для контроля качества лабораторной иммунодиагностики. Официальный сайт компании ЗАО «Медико-биологический союз» (www.mbu.ru/produce.php?ID=460).
17. WHO. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Report Series 2004: 89.
18. ISO 15194:2009 In vitro Diagnostic Medical Devices — Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin, Description of Reference Materials.
19. NIBSC. Anti-syphilitic plasma IgG and IgM human, lyophilized, 3 IU / ampoule, Human 1st International Standard, 2007. WHO International Biological Reference Preparations. Blood products and related substances: Immunoglobulins and Human Sera. Code 05/132 (www.who.int/bloodproducts/catalogue/Bloo-Jan10)
20. The CRBIP — Biological Resource Center of Institute Pasteur (www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00001v-01a/research/collections/crbip).
21. Кувшинова И.Н., Кулешова Е.А., Рукавишников М.Ю. Чувствительность набора реагентов «НБsAg–ИФА–Бест». *Новости «Вектор-Бест»* 2007; 4 (46): 2—5.
22. Кубанова А.А. (ред.) Система внешнего и внутреннего контроля качества лабораторной диагностики заболеваний, передаваемых половым путем, в Российской Федерации (Основные положения). М: ГУ «ЦНИКВИ Росздрав» 2006: 21—22 (www.cnikvi.ru/files/398_all.pdf).
23. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1288-03 «Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов». Утв. Гл. гос. санитарным врачом Российской Федерации 17.04.2003 г.
24. Ricós C., Juvany R., Simón M. et al. Commutability and traceability: their repercussions on analytical bias and inaccuracy. *Clin Chim Acta* 1999; 280 (1—2): 135—145.
25. Курбатова Е.А. Контрольные материалы для биохимических исследований. *Новости «Вектор-Бест»* 2000; 1 (15) (www.vector-best.ru/nvb/cont15.htm).
26. Гаранина Е.Н. Качество лабораторного анализа. Факторы, критерии и методы оценки. М: ТОО Лабинформ 1997.
27. Ивченко С.Н., Суслопаров И.М., Масычева В.И. и др. Конструирование жидкой панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела класса IgG к цитомегаловирусу человека. *Вестник ПАМН* 2004; 8: 37—40.
28. Castro A.R., Kikkert S.E., Fears M.B. et al. Defibrination of blood plasma for use in serological tests for syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9 (6): 1376—1378.
29. Канев А.Н., Воробьева М.С., Шалунова Н.В. и др. Разработка стандартных панелей сывороток для контроля качества иммуноферментных тест-систем в России. *Вестник ПАМН* 1998; 3: С. 47—51.
30. Jeffcoate S.L. WHO guidelines for the preparation of international standards and other reference materials for biological substances. *Dev Biol Stand* 1992; 74: 195—201.
31. Gomme P., Tafford O., Johnson A. et al. Investigating of effect pumping on plasma products. Plasma product Biotechnology Meeting. Crete, Greece 9—12 May 2005: 29.
32. Канев А.Н., Шалунова Н.В., Нетесов С.В. и др. Конструирование референс-панели сывороток к вирусу гепатита С с нормированным уровнем IgG-антител. *Вопросы вирусологии* 2000; 45 (4): 42—47.
33. Nail S.L., Jiang S., Chongprasert S., Knopp S.A. Fundamentals of freeze-drying. *Pharm Biotechnol* 2002; 14: 281—360.
34. Imamura K., Ogawa T., Sakiyama T. et al. Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. *Journal Pharm Sci* 2003; 92 (2): 266—274.
35. Jovanović N., Bouchard A., Hofland G.W. et al. Distinct effects of sucrose and trehalose on protein stability during supercritical fluid drying and freeze-drying. *Eur Journal Pharm Sci* 2006; 27 (4): 336—345.
36. Jovanović N., Bouchard A., Sutter M. et al. Stable sugar-based protein formulations by supercritical fluid drying. *Int Journal Pharm* 2008; 346 (1—2): 102—108.
37. Хенох М.А., Першина В.П., Лапинская Е.М. Влияние глубокого замораживания на белковые растворы. *Цитология*, 1966; 8 (6): 769—772.
38. Воробьева М.С., Шаламберидзе Т.Д., Федорова Г.В. и др. Стандартная панель позитивных и негативных к вирусу иммунодефицита человека сывороток крови для оценки чувствительности и специфичности диагностических иммуноферментных тест-систем. *Вопросы вирусологии* 1990; 35 (2): 125—128.
39. Schellekens H., Casadevall N. Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences. *J Neurol* 2004; 251 (Suppl 2); II: 4—9.
40. MacLennan S., Barbara J. Risks and side effects of therapy with plasma and plasma fractions. *Best Pract Res Clin Hematol* 2006; 19 (1): 169—189.
41. Костантино Г.Р., Швендерман С.Р., Лангер Р. и др. Повреждение препаратов лиофилизированных белков. *Биохимия* 1998; 63 (3): 422—429.
42. Денатурация белков (www.xumuk.ru/biologhim/015.html).
43. Залесских Н.В., Кокорева М.Н., Сивилева Т.В. Система внешнего и внутреннего контроля качества в иммуноферментном анализе. Информационные материалы. Н. Новгород: НПО «Диагностические системы» 2007.
44. Канев А.Н., Воробьева М.С., Шалунова Н.В. и др. Конструирование стандартных панелей сывороток с нормированным уровнем IgG антител. *Вопросы вирусологии* 1996; 41 (4): 161—166.
45. Lichstein Herman C.; Malcolm H. Soule. Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. *Journal of Bacteriology* 1943; 47 (3): 221—230.
46. Масыго А.В. Некоторые ошибки при постановке ИФА. *Новости «Вектор-Бест»* 1997; 1 (3): 3—7 (http://www.vectir-best.mhost.ru/nvb/st3_7.htm).
47. ProClin® Preservatives. Mechanism of Action. (www.safcglobal.com/safc-supply-solutions/en-us/home/diagnostics/our-offer).
48. Bronodox® L. Описание продукта (www.borealischem.com/link.php?n=5&product=BRONIDOX%AE%20L).
49. Brande J., Landkjaer L. Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulations, and pH. *Acta Pharm Nord* 1992; 4 (3): 149—158.
50. Приказ Минздрава Российской Федерации № 2 от 09.01.1998 г. «Об утверждении инструкций по иммуносерологии». (Приложение 2. «Инструкция по изготовлению стандартных изоагглютинирующих сывороток для определения групп крови системы АВО»).

51. Курашвили Л.В., Беседина Н.Ф. и др. Оценка жидкой сыворотки человека, используемой для контроля качества клинико-биохимических исследований. *Клин. лаб. диагност.* 1995; 1: 6—8.
52. Пат. RU 2011202 С1 «Стабилизирующий состав для получения лиофилизированных положительных контрольных сывороток, используемых в тест-системах для определения специальных антител к вирусам и микроорганизмам». Шалаев Е.Ю., Гутова Е.А., Канев А.Н. Бюллетень от 15.04.1994: (www.ntpo.com/patents_medicine/medicine_6/medicine_1019.shtml).
53. Costantino H., Schwendeman S., Griebenov K. et al. The secondary structure and aggregation of lyophilized tetanus toxoid. *J Pharm Sci* 1996; 85 (12): 1290—1293.
54. Crotts G., Park T. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *Control Release* 1997; 44: 123—134.
55. Sola-Penna M., Meyer-Fernandes J. Stabilisation against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars. *Arch Biochem Biophys* 1998; 360 (1): 10—14.
56. Chang L.L., Shepherd D., Sun J. et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix. *Journal Pharm Sci* 2005; 94 (7): 1427—1444.
57. Han Y.Jin., B.S., Lee S.B. et al. Effects of sugar additives on protein stability of recombinant human serum albumin during lyophilization and storage. *Arch Pharm Res* 2007; 30 (9): 1124—1131.
58. Li B., O'Meara M.H., Lubach J.W. et al. Effects of sucrose and mannitol on asparagine deamidation rates of model peptides in solution and in the solid state. *Journal Pharm Sci* 2005; 94 (8): 1723—1735.
59. Lau P.P., Van Handel M., Larvin M. et al. Proteolytic degradation of human recombinant proinsulin/insulin by sera from acute pancreatitis patients and complete inhibition by Eglin-C. *Pancreas* 1990; 5 (1): 17—26.
60. Hsieh S.Y., Chen R.K., Pan Y.H., Lee H.L. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *Proteomics* 2006; 6 (10): 3189—3198.
61. Yi J., Kim C., Gelfand C.A. Inhibition of intrinsic proteolytic activities moderates preanalytical variability and instability of human plasma. *Journal Proteome Res* 2007; 6 (5): 1768—1781.
62. Альфа-1-антитрипсин (antitrypsin) (www.xumuk.ru/biospra-vochnik/67.html; krugsever.ru/spravohnik/204-alfa-1-antitripsin.html).