

УДК 57.083.3

© А. И. Гордиенко, 2009.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО И АНТИЭНДОТОКСИНОВОГО СЕКРЕТОРНОГО IGA ЧЕЛОВЕКА

А. И. Гордиенко*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь.*

QUANTITATIVE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETERMINATION OF TOTAL AND ANTIENDOTOXIN HUMAN SECRETORY IGA

A. I. Gordienko

SUMMARY

Quantitative two-site and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of total and antiendotoxin human sIgA are developed. The basic area of application of the designed ELISA are investigations of role mucosal immunity in pathogenesis of human diseases. Designed ELISA can be used for an estimation of efficiency of mucosal vaccines and polybacterial immunostimulators, rendering primary influence on MALT-system.

ВИКОРИСТАННЯ ТВЕРДОФАЗНОГО ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ТА АНТИЕНДОТОКСИНОВОГО СЕКРЕТОРНОГО IGA ЛЮДИНИ

А. І. Гордієнко

РЕЗЮМЕ

Розроблені твердофазні імуноферментні тест-системи для визначення загального та антиендоксинного секреторного IgA людини. Основною областю застосування сконструйованих тест-систем є дослідження, спрямовані на подальше вивчення ролі мукозального імунітету в патогенезі широкого кола захворювань людини. Крім того, дані тест-системи можуть бути використані для оцінки ефективності застосування мукозальних вакцин і полібактеріальних імуностимуляторів, що роблять переважний вплив на MALT-систему.

Ключевые слова: твердофазный иммуноферментный анализ, определение общего и антиэндоксинного секреторного IgA человека.

Секреторный иммуноглобулин А (sIgA) является основной эффекторной молекулой системы мукозального иммунитета и составляет большую часть иммуноглобулинов в секретах слизистой оболочки носа, бронхов, кишок, а также в слюне и молозиве. В отличие от сывороточного IgA, sIgA представляет собой полимерную молекулу, которая чаще всего состоит из двух или четырех мономерных субъединиц IgA, соединенных между собой J-цепью - небольшим полипептидом с молекулярной массой (ММ) 15 кДа. Кроме того, в состав sIgA входит секреторный компонент (SC) – полипептид с ММ около 80 кДа, который является протеолитическим фрагментом внеклеточной части полимерного иммуноглобулинового рецептора (pIgR), обеспечивающего трансэпителиальный транспорт IgA-димеров [1-4].

sIgA играет важную роль в защите мукозальных поверхностей (МП) от колонизации и инвазии патогенными бактериями, вирусами и простейшими. В течение дня в просвет желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) взрослого человека секретируется около 40 мг sIgA в пересчете на 1 кг массы тела, что почти в 1,5 раза превышает ежедневную продукцию IgG (около 30 мг/кг). При этом sIgA способен формировать иммунные комплексы (ИК) не только с инфекционными агентами и их компонентами, которые находятся на МП, но и с теми из них, которые в силу опре-

деленных причин преодолевают эпителиальный барьер и проникают непосредственно в lamina propria. В последнем случае образующиеся ИК при участии pIgR снова транслоцируются на МП, что служит одним из важных механизмов поддержания “иммуноструктурного” гомеостаза внутренней среды организма. Вместе с тем sIgA индифферентен по отношению к нормальной симбиотной микрофлоре МП. К тому же в отличие от других иммуноглобулинов, sIgA не взаимодействует с компонентами системы комплемента, и поэтому образуемые им ИК не оказывают повреждающего действия на МП [5-8].

По данным литературы, вследствие ряда особенностей, присущих структурно-функциональной организации мукозальной иммунной системы, антигенное воздействие на индуктивные сайты лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (Gut-Associated Lymphoid Tissue, GALT), сопровождается развитием иммунного ответа не только в ЖКТ, но и в других органах, имеющих МП [6, 7, 9, 10]. Благодаря этому представляется возможным по содержанию и динамике изменений уровней антител различных классов в таком легкодоступном биологическом материале, каковым является слюна, изучать не только местный иммунитет ротовой полости, но и в определенной мере оценивать состояние эффекторного звена системы мукозального иммунитета в целом. В

одной из недавних работ немецких исследователей было показано, что у детей с гемолитическими энтеропатиями повышение содержания в слюне IgA и IgM, специфичных к ЛПС *E. coli* O157, может служить чувствительным иммунологическим маркером кишечных заболеваний, вызываемых этим микроорганизмом [11]. Однократная парентеральная вакцинация обезьян рибосомальной вакциной *Shigella sonnei* (PB3) приводила не только к нарастанию уровней специфических IgA-, IgM- и IgG-антител в сыворотке крови, но и к появлению специфических sIgA-антител в слюне. При этом как парентеральная иммунизация PB3, так и пероральное заражение животных вирулентной культурой *S. sonnei* вызывали сходную по интенсивности стимуляцию мукозального иммунитета [12].

Значительный интерес, на наш взгляд, может представлять исследование уровней sIgA, специфичных к антигенным детерминантам липополисахаридов (ЛПС) энтеробактерий. В силу целого ряда обстоятельств ЛПС относятся к числу облигатных антигенов естественной среды обитания человека. С одной стороны, это определяется тем, что множество видов грамотрицательных микроорганизмов не только повсеместно распространены в окружающей среде, но и колонизируют МП тела человека. С другой стороны, ЛПС обладают высокой химической стабильностью. Так, например, для полной термической инактивации ЛПС необходима 4-часовая экспозиция при +160°C. Поэтому в следовых количествах ЛПС присутствуют практически везде: в воде, воздухе, пищевых продуктах, домашней пыли и т.д. При этом в зависимости от места проживания (город или сельская местность), а также от климатических и санитарно-гигиенических условий, концентрация ЛПС, контаминирующих объекты окружающей среды, может существенно варьировать [13, 14].

Помимо внешней среды, естественным резервуаром ЛПС и одним из важных источников их поступления в организм человека являются дистальные отделы ЖКТ. Нормоценотическая микрофлора кишечника, представленная в том числе и широким спектром различных видов грамотрицательных бактерий, играет существенную роль в формировании GALT-системы и поддержании ее нормального функционирования. Показано, что у мышей, выросших в гнотобиотических условиях, наблюдается недоразвитие иммунокомпетентных органов и уменьшение бактерицидной и фагоцитарной активности плазмы крови; в слизистой оболочке кишечника таких животных имеет место существенный дефицит IgA-плазматинов, а в сыворотке крови практически не обнаруживается IgA и понижено содержание IgM и IgG. Колонизация кишечника мышей-гнотобионтов микрофлорой, выделенной от обычных мышей, приводит к довольно быстрой нормализации указанных показателей. При этом позитивный вектор воздей-

ствия кишечной микрофлоры на GALT-систему во многом обусловлен стимулирующим влиянием ЛПС на лимфоидные структуры ЖКТ [15].

Таким образом, в силу перечисленных выше обстоятельств все МП организма человека постоянно в большей или меньшей степени контактируют с ЛПС широкого спектра грамотрицательных бактерий. Представляется достаточно очевидным, что такая перманентная антигенная стимуляция ЛПС MALT-системы должна проявляться в поддержании некоторого сугубо индивидуального базового уровня синтеза антиэндотоксиновых sIgA различной специфичности (анти-ЛПС-sIgA), включая антитела к высококонсервативным антигенным эпитопам внутренней области олигосахаридного кора (анти-Kop-sIgA). Следовательно, с помощью мониторинга за содержанием анти-ЛПС-sIgA и анти-Kop-sIgA можно оценивать не только уровень антигенного воздействия ЛПС на индуктивные сайты GALT-системы, но и, в определенной мере, контролировать функциональное состояние системы мукозального иммунитета в целом. Особенно информативным такой подход может оказаться при оценке эффективности применения иммуномодуляторов и мукозальных вакцин, оказывающих преимущественное влияние на параметры мукозального иммунитета. Тем не менее, анализ доступной нам литературы показал, что исследования, посвященные проблеме изучения мукозального антиэндотоксинового иммунитета, опосредуемого антиэндотоксиновыми sIgA и реализуемого непосредственно на МП - т.е., там, где находится первая линия иммунной защиты организма от потока разнообразных антигенов, включая ЛПС, до настоящего времени практически не проводились, что в первую очередь связано с отсутствием соответствующей методологической базы. В связи с этим целью данной работы являлось конструирование твердофазных иммуноферментных тест-систем, предназначенных для количественного определения sIgA, специфичных к антигенным эпитопам ЛПС энтеробактерий, включая высококонсервативные антигенные детерминанты внутренней области олигосахаридного кора молекулы ЛПС, а также общего sIgA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источником антител, специфичных к sIgA человека (анти-sIgA-АТ), служила коммерческая козья антисыворотка к sIgA человека (ООО "Микрофлора" при МНИИ им. Г.Н. Габричевского, Россия). Фракцию IgG, содержащую в своем составе анти-sIgA-АТ, выделяли преципитацией сульфатом аммония и дополнительно очищали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе [16]. Иммунопероксидазный конъюгат (анти-sIgA*HRP) получали конъюгированием очищенных анти-sIgA-АТ с пероксидазой хрена периодатным методом [17].

В качестве антигенов при определении анти-ЛПС-

sIgA различной специфичности использовали коммерческие препараты ЛПС *Escherichia coli* K235 и *Salmonella minnesota* Re-595 (Sigma Chem. Co., USA).

Твердофазный иммуноферментный анализ (тИФА) проводили по следующей общей схеме. Для получения слоя иммуносорбента при определении анти-ЛПС-sIgA и анти-Kop-sIgA в лунках полистироловых планшетов (Costar 9017, USA) иммобилизовали соответственно ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* Re-595, используя для этого методические подходы, разработанные нами ранее [19, 20, 21]. Концентрация указанных антигенов в буфере для иммобилизации составляла 10 мкг/мл. При определении общего sIgA слоем иммуносорбента на твердой фазе служили очищенные анти-sIgA-АТ, которые иммобилизовали физической сорбцией из 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 1%-й NaCl (PBS) в течение 12-14 час при комнатной температуре (18-20°C).

Для удаления несвязавшихся компонентов и блокирования свободных центров связывания лунки промывали (4 раза по 1 мин) PBS, содержащим 0,05%-й Tween-20 (ICN, USA) (PBS-T). Затем в лунки последовательно вносили по 100 мкл разведенной PBS-T ротовой жидкости (1:10 при определении анти-ЛПС-sIgA или 1:200 при анализе общего sIgA) или стандарта sIgA человека, и иммунопероксидазного конъюгата анти-sIgA*HRP. Для оценки уровня неспецифических реакций лунки с иммобилизованными препаратами ЛПС или анти-sIgA-АТ обрабатывали только конъюгатом анти-sIgA*HRP в соответствующем разведении. С каждым реагентом проводили 60-минутную инкубацию при 37°C. Неспецифически связавшиеся компоненты после каждого этапа тИФА удаляли промывкой лунок PBS-T (4 раза по 1 мин). Для регистрации пероксидазной активности в лунки вносили по 100 мкл 30 мМ фосфатно-цитратного буфера (pH 5,0), содержащего 0,33 мг/мл о-фенилендиамина (Sigma Chem. Co., USA) и 0,02% H₂O₂, и инкубировали 60 мин при 37°C. Реакцию останавливали прибавлением в лунки 25 мкл 3М серной кислоты. Оптическую плотность конечного продукта ферментативной реакции определяли с помощью иммуноферментного анализатора Stat Fax 2100 (Awareness Tech. Inc., USA) при длине волны 492 нм. Для построения калибровочной кривой при определении концентрации sIgA в образцах ротовой жидкости использовали коммерческий стандарт sIgA человека (ООО "Микрофлора" при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Россия).

Все эксперименты проводили в 3-кратной повторности. Каждая точка кривых на рисунках, приведенных в разделе "Результаты и обсуждение", представляет собой среднее значение, полученное для 3 параллельных опытов. При этом величина стандартной ошибки не превышала 7% от среднего значения измеряемого показателя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы, содержание общего sIgA в слюне практически здоровых людей достаточно высоко и в среднем составляет 70-110 мг/л [21]. Это обстоятельство значительно упрощает конструирование иммуноферментного диагностикума, предназначенного для количественного определения концентрации общего sIgA в биологических жидкостях, поскольку в данном случае нет необходимости добиваться предельной чувствительности анализа, достаточно обеспечить его специфичность и воспроизводимость. Из всего многообразия известных на сегодняшний день различных вариантов тИФА, отличающихся по характеру используемых реагентов и последовательности отдельных этапов [22], для решения поставленной задачи был выбран двухцентровый метод тИФА (или так называемый "sandwich"-метод), который включает две последовательные стадии. На первой стадии анти-sIgA-АТ, иммобилизованные на поверхности твердой фазы, взаимодействуют с находящимся в тестируемом образце sIgA, образуя специфический комплекс {антитело-антиген}. На второй стадии твердую фазу отмывают от несвязавшихся компонентов и инкубируют с анти-sIgA-АТ, конъюгированными с ферментативной меткой. После промывки, необходимой для удаления непрореагировавшего с нерастворимым носителем конъюгата вторичных антител с ферментом, регистрируют ферментативную активность на твердофазном носителе, которая будет пропорциональна концентрации исследуемого антигена.

Для выявления антиэндотоксиновых sIgA различной специфичности за основу был взят непрямой вариант тИФА, также состоящий из двух этапов. На первом этапе специфические sIgA, присутствующие в анализируемом биологическом материале, формируют иммунные комплексы с иммобилизованным на твердой фазе антигенами, которыми в данном случае служили ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* Re-595. На втором этапе образовавшиеся иммунные комплексы {ЛПС-sIgA} выявляют с помощью вторичных антител к sIgA, несущих ферментативную метку.

Таким образом, в основе выбранных вариантов тИФА лежат специфическое иммунохимическое взаимодействие (СПИВ) и неспецифическое адсорбционное взаимодействие (НСАВ). СПИВ между иммунологически активными компонентами определяет специфичность тест-системы, тогда как роль НСАВ неоднозначна: с одной стороны, НСАВ типа "твердая фаза-белок" или "твердая фаза-ЛПС" позволяют сформировать слой иммуносорбента на поверхности твердой фазы; с другой стороны – НСАВ типа "белок-белок" и/или "ЛПС-белок" ведут к появлению фонового сигнала, лимитирующего чувствительность тест-системы. Поскольку СПИВ и НСАВ зависят от целого ряда физико-химических факторов (температура, ионная сила и pH реакционной среды; концентраци-

онные соотношения компонентов и продолжительность их взаимодействия), при конструировании соответствующих тест-систем необходим эмпирический подбор оптимальных параметров проведения реакции для конкретной пары {антиген-антитело} [22].



Рис. 1. Оптимизация условий проведения двухцентрового тИФА для количественного определения sIgA человека.

Иммуноферментная тест-система для количественного определения общего sIgA

В случае тест-системы, предназначенной для количественного определения общего sIgA, оптимизируемыми параметрами были концентрация анти-sIgA-АТ в буфере для иммобилизации на первой стадии тИФА и разведение иммунопероксидазного конъюгата анти-sIgA*HRP на второй стадии тИФА. Критерием оптимизации служило получение максимальной величины полезного сигнала при минимальном уровне неспецифического связывания для фиксированной концентрации стандарта sIgA человека (0,5 мкг/мл), поскольку известно, что высокая чувствительность и воспроизводимость тИФА достигается при как можно более высоком значении этого показателя [22]. Слой иммуносорбента для sIgA на твердой фазе получали наиболее простым, но в тоже время достаточно эффективным методом - физической сорбцией анти-sIgA-АТ из 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 1%-й NaCl и 0,05%-й азид натрия. Сорбцию проводили при комнатной температуре (18-22 С) в течение 12-14 час; при этом концентрация анти-sIgA-АТ в буфере для иммобилизации изменяли от 20 мкг/мл до 0,31 мкг/мл с 2-кратным шагом. Разведение иммунопероксидазного конъюгата анти-sIgA-HRP также варьировало с 2-кратным шагом от 1:2000 до 1:16000. Графический анализ результатов "шахматного титрования"

показал (Рис. 1), что при указанных выше условиях максимальное отношение полезный сигнал/фон достигается в том случае, если концентрация анти-sIgA-АТ в буфере для иммобилизации составляет 5 мкг/мл, а разведение анти-sIgA*HRP - 1:8000. Эти параметры и были приняты в качестве рабочих при разработке иммуноферментного диагностикума для определения общего sIgA человека (Рис. 2).

Сконструированная твердофазная иммуноферментная тест-система для количественного определения общего sIgA (Табл. 1) имеет высокую чувствительность, специфичность и хорошую воспроизводимость и может быть использована для анализа содержания общего sIgA в слюне и других биологических жидкостях. Типичная калибровочная кривая зависимости экстинкции конечного продукта ферментативной реакции от логарифма концентрации sIgA (Рис. 3) в диапазоне концентраций от 0,1 до 5 мкг/мл имеет линейную форму и может быть с высокой степенью точности аппроксимирована с помощью процедуры [Добавить линию тренда...], встроенной в Microsoft Excel. С этой же целью могут быть использованы и другие программные продукты, включая их бесплатные и/или условно бесплатные версии, достаточно широко представленные в Интернете. Применение соответствующего программного обеспечения значительно упрощает и ускоряет расчет содержания sIgA в исследуемых клинических образцах.

Иммуноферментная тест-система для определения уровней антиэндотоксиновых sIgA различной специфичности

В качестве антигенов при определении антиэндотоксиновых sIgA, специфичных к антигенным детерминантам, ассоциированным преимущественно с О-полисахаридной цепью молекулы ЛПС (анти-ЛПС-sIgA), а также антител, специфичных к антигенным эпитопам эндотоксинового кора молекулы ЛПС (анти-Кор-sIgA) были соответственно использованы высокоочищенные препараты ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* Re-595 (Sigma Chem. Co., USA). Обоснование выбора этих антигенов, а также разработанные нами эффективные способы их иммобилизации на поверхности полистироловых планшетов приведены в работах, опубликованных ранее [19, 20, 21]. Концентрация ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* Re-595 в буфере для иммобилизации составляла 10 мкг/мл. При проведении экспериментов по оптимизации условий проведения тИФА источником антиэндотоксиновых sIgA служил пул предварительно отобранных образцов ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом, протекающим на фоне травматической болезни спинного мозга [23]. Оптимальное рабочее разведение конъюгата анти-sIgA*HRP находили следующим образом. После иммобилизации соответствующих антигенов в лунках полистироловых планшетов и блокирования сво-

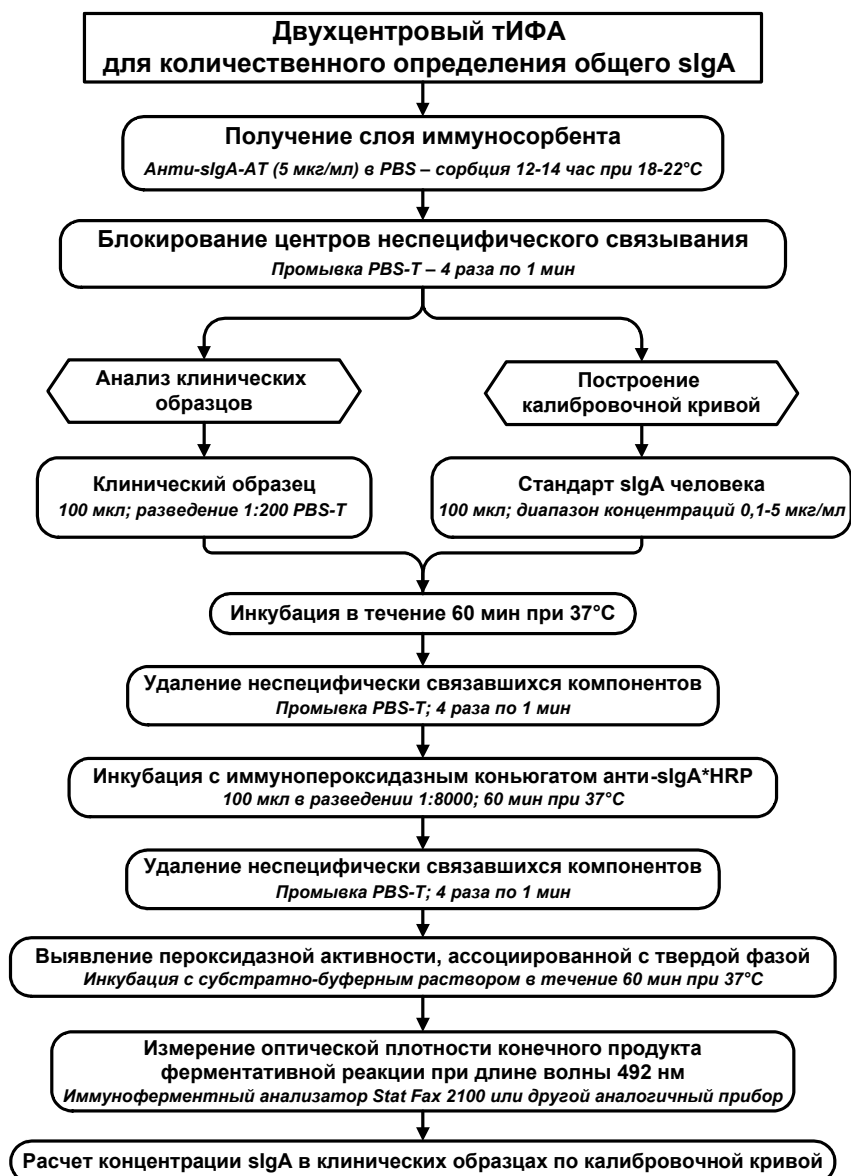


Рис. 2. Блок-схема двухцентрового тИФА для количественного определения sIgA в слюне и других биологических жидкостях.

Таблица 1

Основные параметры твердофазной иммуноферментной тест-системы для количественного определения sIgA человека

Параметр	Характеристика
Принцип анализа	Двухцентровый тИФА ("sandwich"-метод) на основе поликлональных козьих антител, специфичных к sIgA человека
Общая продолжительность анализа	3,5 часа
Ферментативная метка	Пероксидаза хрена
Тип калибровочной кривой	Линейная
Диапазон определяемых концентраций sIgA	0,1 – 5 мкг/мл
Чувствительность	50 нг/мл
Воспроизводимость	± 6 %
Объем пробы (при проведении анализа в двух повторностях)	2 x 5 мкл

Примечание: * - без учета времени, необходимого для получения слоя иммуносорбента на поверхности твердой фазы.

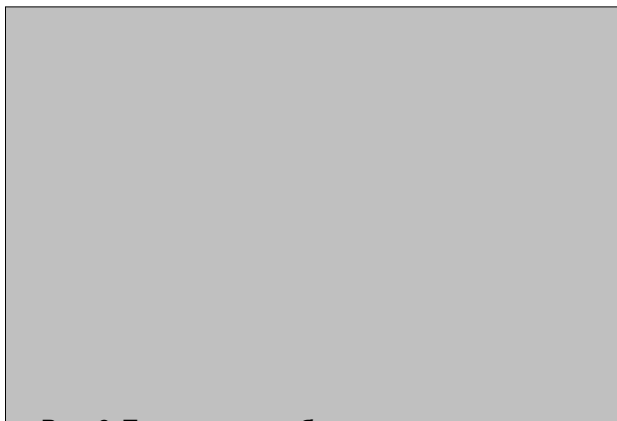


Рис. 3. Типичная калибровочная кривая для определения общего sIgA методом двухцентрового тИФА.

бодных центров связывания в опытный ряд лунок вносили по 100 мкл пулированной ротовой жидкости, разведенной в 10 раз с помощью PBS-T; в контрольный – по 100 мкл PBS-T. После 60-мин инкубации при 37°C и промывки PBS-T (4 раза по 1 мин) в опытные и контрольные лунки добавляли по 100 мкл конъюгата анти-sIgA*HRP, разведенного PBS-T в соотношении 1:125 и раститрованного далее с 2-кратным шагом, и затем снова инкубировали 60 мин при 37°C. Неспецифически связавшийся конъюгат анти-sIgA*HRP отмывали PBS-T (4 раза по 1 мин). Пероксидазную активность регистрировали, как указано в разделе “Материалы и методы”.

Эксперименты показали (Рис. 4), что полученный иммунопероксидазный конъюгат анти-sIgA*HRP характеризуется низким уровнем неспецифического связывания с иммобилизованными на

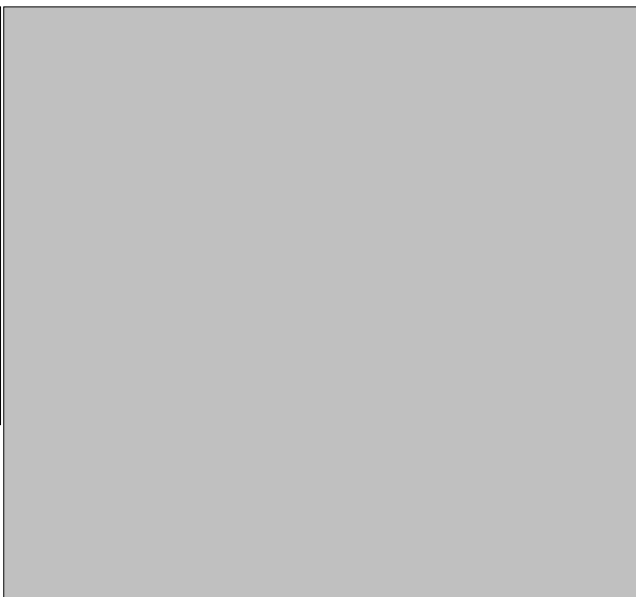


Рис. 4. Выбор оптимальной концентрации иммунопероксидазного конъюгата анти-sIgA*HRP для определения антиэндотоксиновых sIgA различной специфичности.

твердой фазе ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* Re-595 и может быть с успехом применен при определении антиэндотоксиновых sIgA в непрямом варианте тИФА. При использовании в качестве антигена для сенсibilизации твердой фазы ЛПС *E. coli* K235 наибольшее соотношение [полезный сигнал/фон] достигалось при разведении конъюгата анти-sIgA*HRP 1:4000; ЛПС *S. minnesota* Re-595 – 1:2000. С учетом

Таблица 2

Основные параметры твердофазной иммуоферментной тест-системы для количественного определения антиэндотоксиновых sIgA различной специфичности

Параметр		Характеристика	
Принцип анализа		Непрямой тИФА с использованием в качестве вторичных антител иммунопероксидазного конъюгата на основе поликлональных козьих антител, специфичных к sIgA человека	
Используемые антигены	ЛПС <i>Escherichia coli</i> K235	Определяемые антигены	Анти-ЛПС-sIgA
	ЛПС <i>Salmonella minnesota</i> Re-595		Анти-Kop-sIgA
Общая продолжительность анализа*		3,5 часа	
Воспроизводимость		± 8 %	
Объем пробы (при проведении анализа в двух повторностях)		2 x 10 мкл	

Примечание: * - без учета времени, необходимого для получения слоя иммуносорбента на поверхности твердой фазы.

полученных данных была сконструирована чувствительная и селективная твердофазная иммуоферментная тест-система, предназначенная для количественного определения sIgA, специфичного к антигенным детерминантам O-полисахаридной цепи ЛПС *E. coli* K235 (анти-ЛПС-sIgA), а также внутренней области олигосахаридного кора ЛПС энтеробактерий (анти-Kop-sIgA) в слюне и других биологических жидко-

стях (Рис. 5). Уровни анти-ЛПС-sIgA и анти-Kop-sIgA выражают в условных единицах оптической плотности конечного продукта ферментативной реакции для стандартных условий проведения тИФА и фиксированного (1:10) разведения ротовой жидкости. Основные аналитические характеристики данной тест-системы приведены в таблице 2.

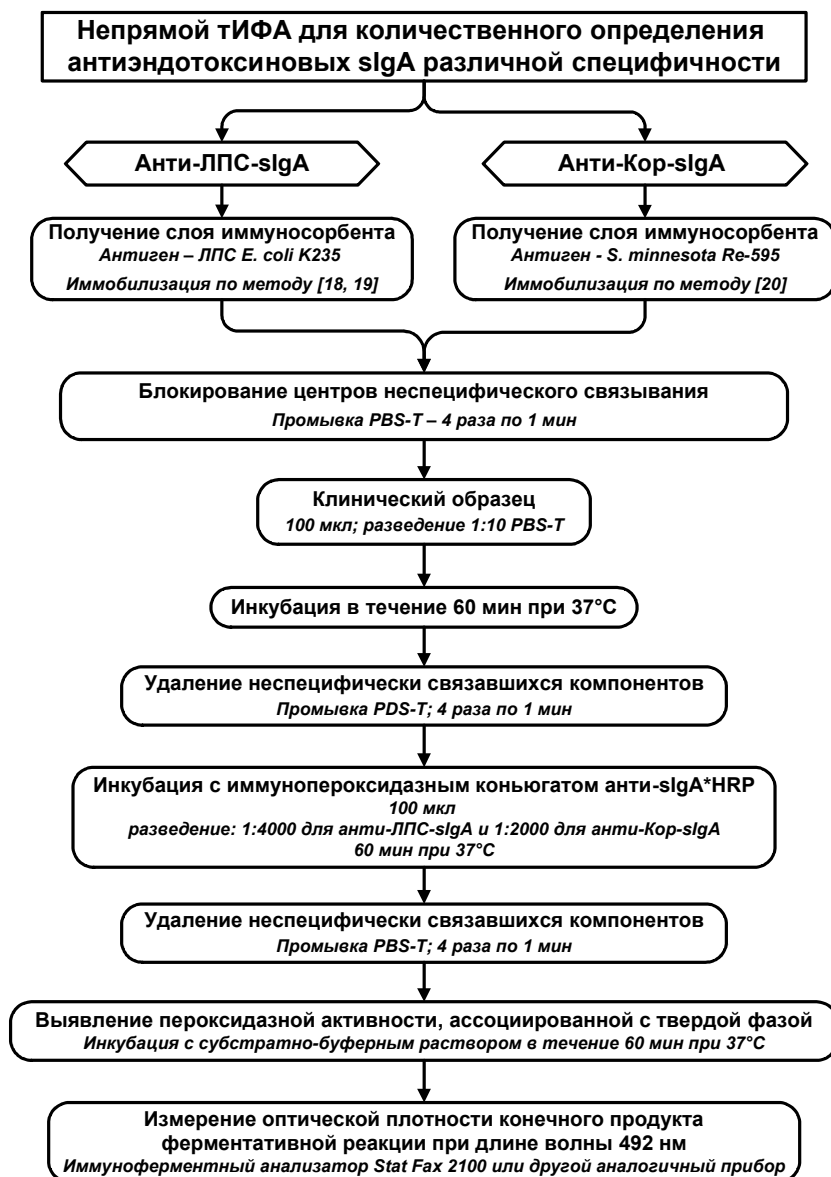


Рис. 5. Блок-схема непрямого тИФА для количественного определения антиэндотоксиновых sIgA в слюне и других биологических жидкостях.

Основной областью применения сконструированных иммуоферментных тест-систем являются исследования, направленные на дальнейшее изучение роли мукозального иммунитета в патогенезе широкого круга заболеваний человека. Кроме того, данные тест-системы могут быть использованы для оценки эффективности применения мукозальных

вакцин и полибактериальных иммуностимуляторов, оказывающих преимущественное воздействие на MALT-систему.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kerr MA. The structure and function of human IgA//Biochem. J.- 1990.- 271, N2.- P. 285-296

2. Woof J.M., Kerr M.A. The function of immunoglobulin A in immunity //J. Pathol.- 2006.- 208, N2.- P. 270-282
3. Woof J.M., Mestecky J. Mucosal immunoglobulins //Immunological Reviews.- 2005.- 206.- P. 64-82
4. Snoeck V., Peters I.R., Cox E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species //Vet. Res.- 2006.- 37, N3.- P. 455-467
5. Brandtzaeg P., Baekkevold E.S., Farstad I.N. et al. Regional specialization in the mucosal immune system //Immunology Today.- 1999.- 20, N3.- P. 141-151
6. Fujihashi K., Kato H., van Ginkel F.W., Koga T. et al. A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance //Acta Odontol. Scand.- 2001.- 59, N5.- P. 301-308
7. Macpherson A.J., Hunziker L., McCoy K., Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms //Microbes Infect.- 2001.- 3, N12.- P. 1021-1035
8. Wines B.D., Hogart P.M. IgA receptors in health and disease //The Authors J. compilation.- 2006.- 68.- P. 103-114
9. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунная система желудочно-кишечного тракта: особенности строения и функционирования в норме и при патологии // Иммунология.- 1997.- №5.- С. 4-7
10. Fagarasan S., Honjo T. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces //Curr. Opin. Immunol.- 2004.- 16, N3.- P. 277-283
11. Ludwig K., Grabhorn E., Bitzan M., Bobrowski C. et al. Saliva IgM and IgA are a sensitive indicator of the humoral immune response to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in children with enteropathic hemolytic uremic syndrome //Pediatr. Res.- 2002.- 52, N2.- P. 307-313
12. Джикидзе Э.К., Стасилевич З.К., Саламатова С.А. Стимуляция секреторной IgA-системы обезьян при парентеральной иммунизации рибосомальной дизентерийной вакциной Зонне //Журн. микробиол.- 1988.- №9.- С. 66-70
13. Liebers V., Bruning T., Raulf-Heimsoth M. Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans //Am. J. Ind. Med.- 2006.- 49, N6.- P. 474-491
14. Radon K. The two sides of the «endotoxin coin» //Occup. Environ. Med.- 2006.- 63, N1.- P. 73-78
15. Ouwehand A., Isolauri E., Salminen S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood //Eur. J. Nutr.- 2002.- 41, Suppl 1.- P. 132-137
16. Методы исследований в иммунологии /Под ред. И.Лефковитса, Б.Перниса.- М.: Мир, 1981.- С. 428-467
17. Антитела. Методы. В 2-х кн. Кн. 2 /Под ред. Д. Кэйти.- М.: Мир, 1991.- 384 с.
18. Гордієнко А.І., Білоглазов В.О. Патент 70193 А. Спосіб визначення антитіл до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій. - Заявл. 29.12. 2003; Опубл. 15.09. 2004. - Бюл. №9
19. Гордиенко А.И. Новый подход к повышению специфичности определения антител к липополисахаридам грамотрицательных бактерий методом твердофазного иммуноферментного анализа //Укр. біохім. журн.- 2004.- 76, №6.- С. 130-135
20. Гордиенко А.И. Методические аспекты определения антител, специфичных к внутренней области олигосахаридного кора липополисахаридов энтеробактерий //Таврический медико-биологический вестник.- 2006.- 9, №1.- С. 131-137
21. Клиническая оценка лабораторных тестов / под ред. Н.У. Тица.- М.: Мир, 1986.- С. 176-178
22. Теория и практика иммуноферментного анализа.- М.: Высшая школа, 1991.- 288 с.
23. Горобец С.М., Гордиенко А.И., Бакова А.А., Белоглазов В.А., Химич Н.В., Нагорный П.А., Мешкова И.Е. Состояние местного антиэндотоксинового иммунитета ротовой полости, цитокиновый профиль ротовой жидкости и гуморальный антиэндотоксिन-овый статус у больных хроническим генерализованным пародонтитом, протекающим на фоне травматической болезни спинного мозга /Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. Труды Крымского государственного медицинского университета.- Симферополь: Изд. центр КГМУ, 2005.- т. 141.- Ч. 5.- С. 37-44.