

Таблиця – Результати спектрофотометричного учета ИФА сывороток крови кроликов, иммунизированных различными микобактериями

Сыворотки кроликов, иммунизированных различными микобактериями	Титры антител, K_{cn}		
	Антигены микобактерий, используемые для сенсibilизации планшета		
	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> -8	<i>M. bovis</i> Vallee
<i>M. bovis</i> BCG	отриц.	1:1600, $K_{cn}=2,3$	1:3200, $K_{cn}=2,3$
<i>M. bovis</i> -8	1:3200, $K_{cn}=2,4$	1:3200, $K_{cn}=3,2$	1:3200, $K_{cn}=3,0$
<i>M. bovis</i> Vallee	1:1600, $K_{cn}=2,1$	1:3200, $K_{cn}=3,9$	1:3200, $K_{cn}=4,0$
<i>M. tuberculosis</i>	1:200, $K_{cn}=2,2$	1:3200, $K_{cn}=3,4$	1:3200, $K_{cn}=3,1$
<i>M. intracellulare</i>	1:3200, $K_{cn}=2,5$	1:3200, $K_{cn}=3,6$	1:3200, $K_{cn}=3,2$
<i>M. avium</i>	1:400, $K_{cn}=2,5$	1:800, $K_{cn}=2,5$	1:800, $K_{cn}=2,5$

Из данных таблицы следует, что полученные антигены микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Vallee позволяют проводить дифференциацию поствакцинальных и постинфекционных антител.

Выводы. 1. Получены антигены микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Vallee и установлена возможность их использования для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных антител к возбудителю туберкулеза крупного рогатого скота.

2. Установлена специфичность полученных микобактериальных антигенов методом иммуноферментного анализа.

Список литературы

- Агеева, Т.Н. Корреляционная зависимость выявления в крови иммунных комплексов и микобактериальных антигенов с помощью ИФА и результатов бактериологической диагностики туберкулеза на среде ВКГ [Текст] / Т.Н. Агеева, А.П. Лысенко, Е.М. Красникова // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2005. – № 2. – С. 39–42.
- Альфредо, Э. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* [Текст] / Э. Альфредо, В.И. Вершинина, К.С. Хаертынов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 1. – С. 18–22.
- Верховский, О.А. Диагностическое значение реакций клеточного иммунитета при туберкулезе крупного рогатого скота [Текст] / О.А. Верховский, А.Х. Найманов, О.А. Савицкая // Актуальные пробл. инфекц. патологии и иммунологии животных; [ВНИИЭВ]. – М., 2006. – С. 180–184.
- Овдиенко, Н.П. Туберкулез как международная и национальная медико-ветеринарная проблема в современных условиях [Текст] / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко // Вет. врач. – 2009. – № 2. – С. 14–17.
- Шуралев, Э.А. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [Текст] / Э.А. Шуралев, Э.В. Ндаишимийе, М.Н. Мукминов // Уч. зап. КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 211. – С. 202–206.
- Якупов, Т.Р. Иммуноблот анализ в диагностике туберкулеза [Текст] / Т.Р. Якупов, К.С. Хаертдинов // Вет. врач. – 2011. – № 1. – С. 29–31.
- Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / S. Diabougba [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1997. – Vol. 4, № 3. – P. 334–338.
- Laemmli, U.K. Cleavage structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 [Text] / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
- Roman, F. Deglycosylation of the 45/47 kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* cellular immune responses [Text] / F. Roman, C. Horn, P. Pescher // Inf. Immun. – 1999. – Vol. 67, № 11. – P. 5567–5572.
- Wang, B.L. Antibody response to four secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients [Text] / B.L. Wang, Y. Xu, Z.M. Li // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2005. – Vol. 9, № 12. – P. 1327–1334.

PREPARATION OF MYCOBACTERIAL ANTIGENS OF *M. BOVIS* BCG-1, *M. BOVIS*-8 AND *M. BOVIS* VALLEE FOR DIFFERENTIATION OF POST-VACCINATION AND POSTINFECTIOUS ANTIBODIES

Khismatullina N.A., Khaertynov K.S., Shuralev E.A., Gulyukin A.M., Akhmadeev R.M.,

Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

Naimanov A.Kh.

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, Russia

A new method of M. bovis BCG-1, M. bovis-8, M. bovis Vallee antigens preparation is developed. The antigens allow differentiating postinfectious and post-vaccination antibodies to bovine tuberculosis pathogen. The specificity of mycobacterial antigens in ELISA is established.

УДК 619:578:616.98:578.828.11

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИГЕНПРОДУКУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН FLK-BLV ПІД ВПЛИВОМ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ

Шаповалова О.В., Горбатенко С.К., Кузнецова О.В., М'ягих Н.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Підвищення виходу вірусу лейкозу ВРХ та його антигенів, які продукуються у перещеплюваних культурах клітин, є насущною потребою виробництва. Як відомо, одним з механізмів, що впливають на експресію інтегрованих вірусів, є оксидативний стрес [1]. А. Bondzio та співавтори показали, що у відповідь на короткострокову інкубацію з перекисом водню у низькій концентрації в хронічно інфікованих ВЛВРХ культурах клітин FLK-BLV 44-1 та BL 3.1 активується експресія вірусу лейкозу [2]. Крім того, експериментальними дослідженнями на культурі клітин було доведено, що транскрипційна відповідь BLV на інгібітор деацитилаз гістонів опосередковується активними формами кисню [3].

Виходячи з вказаного вище, метою нашої роботи було випробування активних форм кисню в якості стимулятора продукції антигену ВЛВРХ в перещеплюваній культурі клітин нирки ембріона вівці, хронічно інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби (FLK-BLV).

Матеріали та методи. Клітини FLK-BLV вирощували за загальножививними методиками. Засів клітин проводили у стерильні флакони об'ємом 50–500 см³ і бактеріологічні пробірки з покривними скельцями з концентрацією 100–300 × 10³ клітин/см³ поживного середовища. Експеримент проводили з використанням двох варіантів поживного середовища. Поживне середовище № 1 складалось з 45 % середовища Ігла, 45 %

Розділ 9. Біотехнологія

середовища 199, 10 % нативної сироватки ВРХ. Поживне середовище № 2 відрізнялось від першого вмістом 12–15 % сироватки ВРХ, звільненої від глобулінової фракції (аглобулінова сироватка). До середовищ обох типів додавали пеніцилін 100 ОД/см³ і гентаміцин 40 мг/см³. Пересіви культури виконували послідовно після виповнення моношару.

Вплив активних форм кисню на віруспродукуючу активність перещеплюваної культури FLK-BLV вивчали на прикладі перекису водню у концентраціях (5–20) мкМ у поживному середовищі № 1 для культивування клітин FLK-BLV у режимі 4, 24, 72, 148 годин впливу та при послідовному пасажуванні. Поживне середовище № 2 з додаванням 10 мкМ перекису водню використовували в режимі послідовного пасажування культури клітин.

З метою встановлення погодинного впливу препарат у експериментальних концентраціях додавали на 2 добу культивування після виповнення моношару на 90–100 % з подальшим погодинним спостереженням за морфологічним станом клітин і відбором збірної проби культуральної рідини з флаконів кожної групи для отримання лейкозного антигену. При послідовному пасажуванні культури клітин перекис водню у вказаній концентрації додавали до ростового середовища безпосередньо під час пересіву. В якості контролю використовували культуру клітин FLK-BLV без додавання перекису водню. Усі культуральні дослідження проводили у трьох повторах.

Оцінку впливу H₂O₂ на морфологічні властивості клітин і швидкість формування моношару культури FLK-BLV проводили методом мікроскопії моношару у культуральних флаконах ємністю 500 см³, а також зафіксованих і забарвлених клітин, які вирощували на покривних скельцях. Спостереження проводили щоденно в динаміці пасажування з додаванням різних концентрацій препарату.

Антигени ВЛВРХ для реакції імунодифузії (РІД) виготовляли із збірних проб культуральної рідини експериментальної та контрольної культури клітин FLK-BLV, які концентрували до 1/100 від первинного об'єму. Активність антигенів вивчали серологічним методом граничних розведень в реакції імунодифузії (РІД) з використанням «Набору компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина». Для визначення кінцевого та робочого титрів готували послідовні розведення експериментальних серій антигенів у фосфатно-сольовому фізіологічному розчині, рН 7,0–7,2. Окрім цього в РІД проводили дослідження розведених антигенів та контрольної сироватки (КПС) відповідно.

Кінцевим титром антигену вважали розведення, при якому в РІД спостерігали чітку лінію преципітації з позитивною контрольною сироваткою на один +. Робочим титром антигену вважали таке розведення, при якому спостерігали специфічну реакцію з позитивною контрольною сироваткою на +++++, а при подальшому 2-кратному розведенні антигену результат реакції дорівнював ++.

Результати досліджень. При вивченні впливу перекису водню в концентраціях 5,0 мкМ, 10 мкМ та 20 мкМ препарату у режимі 4, 24, 72, 148 годин впливу та при послідовному пасажуванні протягом 6–7 діб з використанням поживного середовища № 1 було встановлено, що дані концентрації H₂O₂ при вказаних експозиціях не викликали деструктивних морфологічних змін клітин і стану моношару культури FLK-BLV.

Показано, що 4- та 24-годинний вплив 5,0 мкМ, 10 мкМ та 20 мкМ перекису водню на виконаний моношар не змінював антигенпродукуючі властивості культури клітин. Кінцевий титр усіх виготовлених експериментальних і контрольних антигенних препаратів складав 1:2.

Додавання 5,0 мкМ перекису водню на виконаний моношар і контакт клітин моношару з препаратом упродовж 72 годин призвело до підвищення активності антигену, кінцевий титр якого досягав 1:6, а робочий – дорівнював 1:2, що вдвічі перевищувало робочий титр контрольного антигену. Інші концентрації перекису водню за умов 72-годинної експозиції суттєво не впливали на показники активності виготовлених антигенів.

Культивування клітин з різними концентраціями препарату протягом 6 діб не підвищувала кінцеві титри антигенів у порівнянні з контролем.

За отриманими результатами були відібрані оптимальні концентрації та режим експозиції перекису водню для подальших дослідів. Вони склали 5,0 мкМ та 10 мкМ, 72-годинне витримання при додаванні до повністю виконаного моношару, а також внесення препарату до ростового середовища безпосередньо. Дані про вплив оптимальних концентрацій препарату на антигенпродукуючі властивості культури FLK-BLV при послідовному пасажуванні наведені у таблиці 1.

Таблиця 1 – Активність антигенів, отриманих з використанням поживного середовища № 1 та H₂O₂ при послідовному пасажуванні, РІД

№ п/п	Антиген, вміст H ₂ O ₂	Кінцевий титр	Робочий титр
1 пасаж			
1	Дослід, 5, 0 мкМ	1:8	1:3
2	Дослід, 10,0 мкМ	1:6	1:2
3	Контроль	1:7	1:3
2 пасаж			
4	Дослід, 5, 0 мкМ	1:7	1:2
5	Дослід, 10,0 мкМ	1:7	1:3
6	Контроль	1:7	1:2
3 пасаж			
7	Дослід, 5, 0 мкМ	1:6	1:2
8	Дослід, 10,0 мкМ	1:7	1:3
9	Контроль	1:7	1:2

З наведених результатів видно, що з кожним наступним пасажом додавання перекису водню в концентрації 10 мкМ сприяло підвищенню робочого титру антигену в порівнянні з концентрацією 5,0 мкМ і контролем. Опираючись на отримані результати, для подальших дослідів було обрано концентрацію перекису водню 10 мкМ.

Вивчення активності антигенів, отриманих з використанням поживного середовища № 2 з вмістом 10 мкМ H₂O₂ у режимі послідовного пасажування культури клітин показали, що дослідні антигени, отримані на рівні I та II пасажів, були більш активними. Для оцінювання інтенсивності прояву реакції проводили дослідження з контрольною позитивною сироваткою (КПС), розведеною до титру 1:6 (таблиця 2).

Як свідчать дані, наведені в таблиці 2, інтенсивність прояву реакції преципітації в порівнянні з контролем була вищою з дослідними антигенами, які були отримані на рівні I та II пасажів. Це було характерно для нативних антигенів і розведених до титру 1:2. До III пасажу активність дослідного антигену, на відміну від контрольного, значно знизилась.

Також з III пасажу в даній серії експериментів з використанням поживного середовища № 2 почав проявлятися негативний вплив перекису водню на морфологічні характеристики моношару культури клітин FLK-BLV. Якщо на рівні II пасажу в обох групах флаконів з дослідною та контрольною культурою клітин морфологія моношару була ідентичною (клітини були округлими, дрібними, з великою кількістю включень, дуже щільно прилягали одна до одної і місцями утворювали напластування), то на момент III пасажу в 60 % дослідних флаконів моношар було зруйновано на 90–100 %. У решті дослідних ємностей, у порівнянні з контролем, моношар виглядав більш щільним, з напластуваннями. Клітини мали в більшості нетипову, округлу форму з великою кількістю вакуолей та включень.

Таблиця 2 – Активність антигенів, отриманих з використанням поживного середовища № 2 та H₂O₂ при послідовному пасажуванні, РІД

АГ, титр	КПС, титр					
	Нативна	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Дослід I пасаж						
Нативний	++++	++++	+++	-	-	-
1:2	++++	++++	+++	+	-	-
1:3	+	+	+	+	-	-
1:4	-	+	+	+	+	-
Контроль I пасаж						
Нативний	++++	++++	+++	-	-	-
1:2	++++	++++	+++	сліди	сліди	сліди
1:3	+	+	+	-	-	-
1:4	+	+	+	+	+	+
Дослід II пасаж						
Нативний	++++	++++	++++	+	+	+
1:2	+++	+++	+++	++	++	++
1:3	сліди	сліди	сліди	++	++	++
1:4	-	-	-	-	-	-
Контроль II пасаж						
Нативний	++++	++++	++++	+	+	+
1:2	++	++	++	+	+	+
1:3	сліди	сліди	сліди	++	++	++
1:4	-	-	-	-	-	-
Дослід III пасаж						
Нативний	++++	++++	++	+	+	+
1:2	+	++	++	+	-	-
1:3	+	++	++	+	+	+
1:4	-	-	-	-	-	-
Контроль III пасаж						
Нативний	++++	++++	++	-	-	-
1:2	+++	+++	+++	+	-	-
1:3	++	+++	+++	+	+	-
1:4	-	-	+	-	-	-

Висновки. 1. При використанні поживного середовища з нативною сироваткою крові ВРХ внесення перекису водню на 2-добовий виконаний моношар перещеплюваної культури клітин FLK-BLV у концентрації 5,0 мкМ з експозицією 72 години призводить до дворазового підвищення активності лейкоспецифічного антигену у порівнянні з контролем. При послідовному пасажуванні з 10 мкМ перекису водню активність та вихід лейкозного антигену для РІД збільшуються в 1,5 рази. Деструктивні морфологічні зміни клітин і стану моношару культури FLK-BLV під дією перекису водню не спостерігаються.

2. При використанні поживного середовища з аглобуліновою сироваткою в режимі послідовного пасажування перещеплюваної культури клітин FLK-BLV з 10 мкМ перекису водню активність антигену для РІД підвищується на рівні I та II пасажів. З III пасажу відбувається руйнування моношару клітин, як наслідок впливу перекису водню.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати вказують на можливість проведення подальших досліджень впливу перекису водню на антигенпродукуючі властивості культури клітин FLK-BLV у виробничих умовах з використанням середовища № 1, яке складалось з 45 % середовища Ігла, 45 % середовища 199, 10 % нативної сироватки ВРХ.

Список літератури

1. Kurata, S. Sensitization of the HIV-1-LTR upon Long Term Low Dose Oxidative Stress [Text] / S. Kurata // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, № 36. – P. 21798–21802. 2. Bondzio, A. Effects of hydrogen peroxide on bovine leukemia virus expression [Text] / A. Bondzio, P. Blankenstein, S. Risse // Biol. Chem. – 2003. – Vol. 384, № 7. – P. 1063–1072. 3. Kawai, Y. Valproic acid-induced gene expression through production of reactive oxygen species [Text] / Y. Kawai, I. J. Arinze // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66, № 1. – P. 6563–6569.

STUDIES ON THE FLK-BLV PASSAGED CELL CULTURE' ANTIGEN PRODUCTION ACTIVITY UNDER THE REACTIVE OXYGEN EFFECT

Shapovalova O.V., Gorbatenko S.K., Kuznetsova O.V., Myagkih N.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkiv

The effect of hydrogen peroxide on the FLK-BLV passaged cell culture antigen production activity has been studied. It was found that 5,0 and 10,0 μM of the drug induced the 1,5–2,0-fold antigen activity increase depending on the cultivation method.