

## MODERN METHODS OF SPECIFIC IDENTIFICATION OF CELLULAR LINES USED FOR PRODUCTION OF BIOPREPARATIONS AND DIAGNOSTICS OF ANIMAL DISEASES

*Diakonov L.P., Kuleshov K.V., Gal'nbek T.V., Kiselyova D.R.**All Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko of RAAS (ARIEV), Moscow**Podchernyayeva R.Ya., Grinkevych O.M.**Scientific Research Institute of Virology named after D.I. Ivanovsky of RAMS**Materials concerning the modern methods of specific identification of cellular lines used for production of biopreparations and diagnostics of animal diseases are presented in the article.*

УДК 619:616-001.28/.29

## ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ МИКРОБНОГО АНТИГЕНА-РАДИТОКСИНА ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ОЛБ

*Низамов Р.Н., Нефедова Р.В., Шарифуллина Д.Т., Рахматуллина Г.И., Вагин К.Н.**Федеральный центр токсикологической и радиобиологической безопасности животных, г. Казань*

Иммуномониторинг радиационных поражений организма складывается из совокупности показателей, полученных с использованием трудоёмких, сложных, дорогостоящих методов исследований, которые недостаточно информативны, неэкспрессны, часто не учитывают индивидуальные особенности организма, и поэтому проблема разработки новых методов диагностики является актуальной.

В связи с перспективностью современных иммунохимических и серологических методов индикации антигенных веществ и антител инфекционной и неинфекционной природы, в последнее время пристальное внимание исследователей по радиационной биологии привлекают иммунологические методы обнаружения радиоиндуцированных антигенов и радиотоксинов. При этом рабочей гипотезой служило сообщение о том, что ионизирующее излучение, поражая иммунную систему организма, индуцирует лучевые антигены – радиотоксины белковой, липоидной и хиноидной природы, которые могут быть детектированы в иммунохимических реакциях. При моделировании лучевых поражений с радиотоксичностью, обычно в качестве источников лучевых антигенов используют органы и ткани облученных животных, растительные ткани и микроорганизмы [1, 2, 3].

Исходя из этого, задачей настоящих исследований явилась разработка тест-систем для осуществления иммуномониторинга при радиационных поражениях организма.

**Материалы и методы.** В качестве продуцента лучевого антигена – радиотоксина использовали микробы кишечной палочки (*E. coli* шт. «ПЛ-6»), поскольку химический состав микробной клетки существенно отличается от тканевых клеток животного и растительного происхождения. Известно, что гипериммунизация животных тканевыми и растительными антигенами обуславливает синтез гетерологичных антиканевых антител, что ведет к неспецифичности диагностических антисывороток. Для получения лучевых антигенов, клетки *E. coli* выдерживали на твердой питательной среде (МПА) при 37°C в течение 24 часов и по истечении указанной экспозиции подвергали облучению на гамма-установке «Исследователь» в дозе 2,5 Гр. Облученную бакмассу экстрагировали 96 %-ным этанолом в течение 24 часов, после этого экстракт удаляли на вакуумном испарителе. Полученный экстракт стандартизировали стерильным физиологическим раствором (рН 7,0-7,2) до концентрации 5 мг/мл и использовали для гипериммунизации животных.

Гипериммунизацию животных проводили согласно общепринятой в иммунологии схеме иммунизации и через 7 дней после окончания гипериммунизации у животных брали сыворотки. После определения в них титра антител использовали в качестве исходного сырья для изготовления диагностических препаратов.

Из гипериммунных сывороток выделяли глобулины путем осаждения сульфатом аммония с последующей хроматографией на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой и гельфильтрацией на сефадексе G-200. Для получения иммуноферментных препаратов глобулины конъюгировали с ферментом (пероксидаза хрена), используя одноступенчатый глутаральдегидный метод. Очистку конъюгатов проводили путем диализа на колонке с сефадексом; полученные фракции фотометрировали на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 280 и 403 нм. Коэффициент специфичности (Ксп) рассчитывали по соотношению экстинкции 403/280 нм. Иммуноферментные конъюгаты испытывали на активность и специфичность в ИФА (прямой и непрямой «сэндвич» - варианты). Результаты учитывали визуально и спектрофотометрически при длине волны 492 нм по критерию коэффициента специфичности, равного или превышающего 2,0. Контролем служили гомологичный и гетерологичный антигены.

После проверки на активность и специфичность, иммуноферментные пероксидазные конъюгаты (ИФК) расфасовывали в ампулы и лиофилизировали на установке «Лозанна».

Индикацию лучевых антигенов в периферической крови и патологическом материале проводили в прямом варианте ИФА взятых от пораженных внешним ионизирующим излучением животных, в дозах, вызывающих острую лучевую болезнь легкой, средней и тяжелой степени тяжести.

Подготовку антигенсодержащего материала перед иммуноферментным анализом проводили путем прогревания исследуемых сывороток крови облученных (отрицательный контроль) животных в водяной бане при 56°C в течение 10-15 минут для инактивации комплемента, а проб из патологического материала – путем прогревания 10 %-ной взвеси гомогенатов в водяной бане в указанных режимах, используя в дальнейшем для анализа надосадочную жидкость в качестве исследуемого материала.

**Результаты исследований.** В результате проведенных исследований была изготовлена экспериментальная серия иммуноферментного конъюгата (ИФК) на основе антигена микробного происхождения – хиноидного радиотоксина и гомологичного к нему антирадиотоксина.

Активность и специфичность изготовленного диагностикума была испытана на лабораторных (белые мыши – 300, белые крысы – 90, кролики – 60) и с.-х. (овцы – 60, свиньи – 12) животных. Установлено, что радиационное поражение организма сопровождается появлением в сыворотке крови токсических продуктов в титрах 1:8 и выше в ИФА-тесте. При этом титры антигенов (радиотоксинов) коррелировали с дозой облучения животных, то есть значения титров радиоиндуцированных антигенов в ИФА-тесте имели прямую пропорциональную зависимость от степени тяжести лучевой болезни. Сопоставительный анализ

результатов иммуноферментного анализа и клинических проявлений лучевой болезни животных показал, что облученные животные, имеющие титры радиоиндуцированных антигенов в ИФА до 1:8, легче переносят лучевую болезнь и имели тенденцию к выживанию, а животные, имеющие более высокие титры (1:16-1:32) указанных антигенов, переболели тяжелой формой болезни и в большинстве случаев она заканчивалась летальным исходом.

**Выводы.** Таким образом, на основании целенаправленных и комплексных исследований разработан высокоэффективный экспресс-метод диагностики, обладающий специфической и иммунологической активностью при радиационных поражениях, позволяющие проводить динамический иммуномониторинг при данной патологии.

Имуноферментный анализ позволяет выявлять облученных животных на 1-3 день поражения. При этом по уровню содержания радиотоксинов в периферической крови удается определить степень тяжести радиационного поражения животных.

### Список литературы

1. Кузин, А.М. Проблема радиотоксинов / А.М. Кузин // Современные проблемы радиобиологии. – М.: Атомиздат, 1995. – С. 191-218.
2. Мельникова, С.К. Влияние растительных радиотоксинов на животный организм / С.К. Мельникова, В.А. Копылов // Радиотоксины. Под ред. А.М. Кузина. – М.: Атомиздат, 1966. – С. 86-91.
3. Клемпарская, Н.Н. Аутоантитела облученного организма / Н.Н. Клемпарская. – М.: Атомиздат, 1972. – С. 321.

## ELISA TEST-SYSTEM DEVELOPMENT BASED ON MICROBIAL ANTIGEN-RADIOTOXIN FOR SERODIAGNOSTICS OF ACUTE IRRADIATION DISEASE

**Nizamov R.N., Nefyodova R.V., Sharifullina D.T., Rakhmatullina G.I., Vagin K.N.**

*Federal Center for Toxicological and Radiobiological Safety of Animals, Kazan*

*The aim of work was Alisa test-system development based on microbial radiotoxin for serodiagnostics of acute irradiation disease. Using ethanol-extracting method, we isolated irradiation antigen – quinoid radiotoxin from irradiated E. coli cells. The isolated radiotoxin was used as vaccinating agent to obtain antiradiotoxic hyperimmune sera. Marking the globulin of the given sera with horseradish peroxidases, we obtained immunosorbent conjugates, which responded to immunochemical reaction with radiotoxic compounds in target sera irradiated with  $\gamma$ -rays. A dependant of radioantigens titers in blood serum from irradiation dose is established.*

УДК 619:616.98:579.843.95:636.5

## РЕЖИМИ ПРИГОТУВАННЯ АНТИГЕНУ АНТИТІЛЬНОГО ЕРИТРОЦИТАРНОГО ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ПАСТЕРЕЛЬОЗУ (ХОЛЕРИ) ПТИЦІ В РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ

**Плис В.М., Колбасіна Т.В.**

*Дніпропетровська дослідна станція Національного наукового центру  
«Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,*

**Стегній Б.Т.**

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

На сучасному етапі для діагностики і контролю специфічної профілактики багатьох інфекційних хвороб широко використовують серологічні тести, а саме: РНГА, РА, РЗК, РП, РДП, за допомогою яких виявляють антитіла і антигени в різних матеріалах. Ці тести також застосовують при розробці об'єктивних методів оцінки діагностичних та імунобіологічних препаратів та їх ефективності [3, 4].

Чутливість і специфічність РНГА в значній мірі залежить від вибору оптимальних режимів приготування антигенних антигенних еритроцитарних діагностикумів. Технологія виробництва діагностикумів передбачає регламентоване виконання таких умов, як концентрація антигену і його оптимальних доз, концентрації таніну, тривалості танізації, її температурного режиму і часу експозиції, тривалості сенсibilізації та її температурного режиму [1, 2, 5].

Виготовлення високочутливих антигенних антитільних еритроцитарних діагностикумів можливе лише при з'ясуванні комплексного впливу таких факторів, як підготовка вихідної сировини (еритроцитарної маси) стабілізації, танізації та сенсibilізації на взаємодію еритроцитів і антиген-сенситину [3, 4, 6].

Метою досліджень було: встановити оптимальні режими приготування стабільного антигену антитільного еритроцитарного для діагностики пастерельозу (холери) птиці та вивчити його активність та специфічність у РНГА.

Чутливість і специфічність антигенних антитільних еритроцитарних діагностикумів залежать від попередньої обробки еритроцитів різними концентраціями таніну, вихідної концентрації антиген-сенситину і його активності, тривалості експозиції та температурного режиму сенсibilізації. Приготування пастерельозного антигену антитільного еритроцитарного включає наступні етапи: підготовка вихідної сировини, фіксація еритроцитів (стабілізація), обробка еритроцитів таніном (танізація), сенсibilізація танізованих еритроцитів, консервування та ліофілізація готових діагностикумів.

**Матеріали і методи.** Наукові дослідження проводили в лабораторії епізоотології бактеріальних хвороб птиці, лабораторії епізоотології вірусних хвороб птиці Дніпропетровської дослідної станції ННЦ «ІЕКВМ», відділі вивчення хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» під керівництвом доктора вет. наук, професора, академіка НААН України Стегній Б.Т.

Антиген антитільний еритроцитарний для діагностики пастерельозу (холери) птиці в РНГА готували за методом В.В.Германа (1986). В якості гемосенситину використовували музейний штам *Pasteurella multocida* (штам № 1931). В роботі використовували специфічні гіперімунні баранячі пастерельозні сироватки крові з титрами антитіл 1:128-1:256 до *Pasteurella multocida* штам № 1931. Попередньо баранів двократно імунізували внутрішньом'язево в дозі 3,0 см<sup>2</sup> з інтервалом 21 день. Потім цих тварин гіперімунізували за розробленою нами схемою інактивованою формаліном 25 мільярдною зависю пастерел штаму № 1931