

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-46-52>
УДК 616.932:577.27



Оригинальная статья / Research article

Определение активности экспериментального противохолерного иммуноэнтросорбента *in vitro* в дот-иммуноанализе

М. В. Овчинникова✉, Е. Г. Абрамова, М. Н. Киреев, Т. Ю. Кириллова, Н. А. Шарапова,
В. В. Рогожин

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

✉ Контактное лицо: Овчинникова Мария Владимировна. E-mail: ovchinnikovamari2020@mail.ru

ORCID: М. В. Овчинникова – <https://orcid.org/0000-0002-1736-7453>; Е. Г. Абрамова – <https://orcid.org/0000-0002-8798-1547>; М. Н. Киреев – <https://orcid.org/0000-0002-3059-4386>; Т. Ю. Кириллова – <https://orcid.org/0000-0002-6001-870X>; Н. А. Шарапова – <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>; В. В. Рогожин – <https://orcid.org/0000-0002-5751-2416>.

Статья поступила: 03.03.2021

Статья принята в печать: 12.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. По оценке Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от 1 до 4 миллионов человек заражаются холерой, и порядка 143 000 человек становятся жертвой этой инфекции. На данном этапе седьмой пандемии холеры ВОЗ и ее партнеры активно оценивают новые методы в лечении и профилактике холеры в дополнение к существующим традиционным мерам. Сегодня для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта широко применяются энтеросорбенты. Ранее сообщалось о результатах конструирования специфического энтеросорбента, оказывающего нейтрализующее действие в отношении холерного энтеротоксина. Для контроля токсиннейтрализующей активности компонентов и готового экспериментального препарата применяется метод кожной пробы по Крейгу, который имеет существенные недостатки: длительность анализа, использование дорогостоящих биомоделей и т. д. Также важна этическая сторона методов *in vivo*, диктующая необходимость гуманизации экспериментов и замены млекопитающих менее развитыми живыми объектами, использованием физико-химических и иммунохимических систем.

Цель. Совершенствование методических подходов к определению активности полуфабриката и готового препарата энтеросорбента в непрямом дот-иммуноанализе (ДИА) с использованием неферментного диагностикума – наночастиц коллоидного золота.

Материалы и методы. Использовали антитоксические кроличьи иммуноглобулины и экспериментальные серии противохолерного иммуноэнтросорбента. Определение токсиннейтрализующей активности проводили по Крейгу на взрослых кроликах. В непрямом ДИА использовали гидрозоль золота, сорбционно связанный со стафилококковым белком А и стабилизированный раствором ПЭГ-20000.

Результаты и обсуждение. В непрямом ДИА определены значения титров специфических антител в образцах компонентов препарата (от 1:6400 до 1:12800) и готового энтеросорбента (от 1:6400 до 1:25600). Специфичность теста подтверждена отрицательными результатами с нормальными кроличьими иммуноглобулинами. Проведен сравнительный анализ уровня токсиннейтрализующей активности антитоксических иммуноглобулинов и противохолерного энтеросорбента, определенных в кожной пробе по Крейгу и ДИА: коэффициент корреляции составил 0,93 и 0,97 соответственно.

Заключение. Разработанные методические подходы к проведению непрямого ДИА с диагностикумом на основе белка *A. S. aureus* и наночастиц коллоидного золота могут быть использованы для определения уровня активности антитоксических иммуноглобулинов и экспериментального иммуноэнтросорбента, а корреляция результатов тестов *in vitro* и *in vivo* позволяет рекомендовать непрямой ДИА на этапах контроля при изготовлении специфического противохолерного энтеросорбента.

Ключевые слова: холера, противохолерный энтеросорбент, антитоксические иммуноглобулины, титр антител, дот-иммуноанализ, наночастицы коллоидного золота

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. В. Овчинникова и Е. Г. Абрамова разработали эксперимент. М. Н. Киреев и Н. А. Шарапова сконструировали неферментный диагностикум на основе белка *A. S. aureus* и наночастиц коллоидного золота. Т. Ю. Кириллова и В. В. Рогожин провели исследование специфической активности экспериментального препарата и его составляющих в кожной пробе по Крейгу. М. В. Овчинникова и М. Н. Киреев разработали методические подходы к проведению непрямого ДИА для определения активности сконструированного энтеросорбента. М. В. Овчинникова и Е. Г. Абрамова участвовали в написании текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении полученных результатов.

Для цитирования: Овчинникова М. В., Абрамова Е. Г., Киреев М. Н., Кириллова Т. Ю., Шарапова Н. А., Рогожин В. В. Определение активности экспериментального противохолерного иммуноэнтросорбента *in vitro* в дот-иммуноанализе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):46–52. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-46-52>

Determination of the Activity of an Experimental Anti-choleric Immunoenterosorbent *in Vitro* in Dot-immunoanalysis

Maria V. Ovchinnikova✉, Elena G. Abramova, Michail N. Kireev, Tatiana Yu. Kirillova,
Natalia A. Sharapova, Vadim V. Rogozhin

Russian Research Anti-Plague Institute Microbe, 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia

✉ Corresponding author: Maria V. Ovchinnikova. E-mail: ovchinnikovamari2020@mail.ru

© Овчинникова М. В., Абрамова Е. Г., Киреев М. Н., Кириллова Т. Ю., Шарапова Н. А., Рогожин В. В., 2022

© Ovchinnikova M. V., Abramova E. G., Kireev M. N., Kirillova T. Yu., Sharapova N. A., Rogozhin V. V., 2022

ORCID: Maria V. Ovchinnikova – <https://orcid.org/0000-0002-1736-7453>; Elena G. Abramova – <https://orcid.org/0000-0002-8798-1547>; Michail N. Kireev – <https://orcid.org/0000-00023059-4386>; Tatiana Yu. Kirillova – <https://orcid.org/0000-0002-6001-870X>; Natalia A. Sharapova – <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>; Vadim V. Rogozhin – <https://orcid.org/0000-0002-5751-2416>.

Received: 03.03.2021 Revised: 12.04.2022 Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. At the rate of World health organization from 1 to 4 million people annually get infected with cholera, and around 143 000 people become a victim of this infection. At this point of seventh pandemic WHO and its partners actively evaluate new methods of treatment and prevention of cholera in addition to existing traditional methods. Today enterosorbents are widely used for treatment and prevention of number of infectious diseases of the gastrointestinal tract. Previously reported about results of construction of specific enterosorbent, which having a neutralizing effect regard to choleric enterotoxin. For toxin-neutralizing activity of components and finalized product control applied Craig dermal test method, which have significant disadvantages: duration of analysis, using expensive biomodels, etc. Ethical side of *in vivo* methods is also important, which dictating necessity of experiment humanization and replacing mammals to less evolved living objects, using physicochemical and immunochemical systems.

Aim. Methodical approach improvement of definition activity of semi-finalized and completed enterosorbent product in indirect in dot-immunoanalysis (DIA) with using non-enzymatic diagnosticum based on colloidal gold nanoparticles.

Materials and methods. Were used antitoxic rabbit immunoglobulins and experimental series of anicholeraic immunoenterosorbent. Definition of toxin-neutralizing activity carried out by Craig test on adult rabbits. In indirect DIA were used hydrosol gold, connected with staphylococcus protein A by sorption and stabilized with solution PEG-20000.

Results and discussion. In indirect DIA identified titers of specific antibody in product component samples composed from 1:6400 to 1:12800, while in completed enterosorbent the titers composed from 1:6400 to 1:25600. Specificity of test is confirmed by negative results with standard rabbit immunoglobulins. Comparative analysis of toxin-neutralizing activity level of antitoxin immunoglobulins and anicholeraic enterosorbent, determined in Craig dermal test and DIA was performed: the correlation coefficient composed 0,93 and 0,97 respectively.

Conclusion. Developed methodical approaches to indirect DIA conduction with *S. aureus* protein A based diagnosticum and colloidal gold nanoparticles can be used for determination of antitoxic activity level of immunoglobulins and experimental immunoenterosorbent. Correlation of *in vitro* and *in vivo* tests allows to recommend indirect DIA on control stages during specific anticholeraic enterosorbent production.

Keywords: cholera, anti-choleric enterosorbent, antitoxic immunoglobulins, antibody titer, dot-immunoanalysis, colloidal gold nanoparticles

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria V. Ovchinnikova and Elena G. Abramova developed experiment. Michail N. Kireev and Natalia A. Sharapova construct *S. aureus* protein A and colloidal gold nanoparticles based non-enzymatic diagnosticum. Tatiana Yu. Kirillova and Vadim V. Rogozhin conduct investigation of specific activity of experimental product and it's components in Craig dermal test. Maria V. Ovchinnikova and Michail N. Kireev developed methodical approaches to conducting indirect DIA for determination constructed enterosorbent activity. Maria V. Ovchinnikova and Elena G. Abramova participated in writing text of the article. All authors took part in the discussion of the results.

For citation: Ovchinnikova M. V., Abramova E. G., Kireev M. N., Kirillova T. Yu., Sharapova N. A., Rogozhin V. V. Determination of the activity of an experimental anti-choleric immunoenterosorbent *in vitro* in dot-immunoanalysis. *Drug development & registration*. 2022;11(2):46–52. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-46-52>

ВВЕДЕНИЕ

Холера остается одной из серьезных проблем мирового здравоохранения в связи с эпидемиями на различных континентах и появлением измененных вариантов *Vibrio cholerae* O1. По оценке Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от 1 до 4 миллионов человек заражаются холерой, и порядка 143 000 человек становятся жертвой этой инфекции. До 2030 г. борьба с холерой является одной из приоритетных задач глобальной дорожной карты ВОЗ, в которой поставлена цель по сокращению смертности от холеры на 90 % и прекращению распространения инфекции в 20 странах¹. Неблагоприятный прогноз по холере в мире, обусловленный

продолжающимися масштабными эпидемиями и крупными вспышками, определяет неблагоприятный прогноз по холере для России в плане угрозы заносов инфекции в результате интенсивной миграции населения, в том числе из стран, неблагополучных по холере [1, 2]. На данном этапе седьмой пандемии холеры ВОЗ и ее партнеры активно проводят оценку новых методов в лечении и профилактике данного конвенционного заболевания в дополнение к существующим традиционным мерам^{2,3}.

В последнее время для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта стали широко применяться энтеросорбенты, которые, по мнению многих авторов, являются перспективным лекарственным средством [3]. При

¹ Заболеваемость холерой в мире снизилась, ключевые эндемичные страны сообщают об успехах в борьбе с холерой. 19 декабря 2019 г. Женева. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/> Ссылка активна на 19.01.2020.

² Холера. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cholera>. Ссылка активна на 19.01.2020.

³ Cholera control. Available at: <https://www.gtfcc.org/> Accessed: 20.01.2020.

холере, ротавирусных гастроэнтеритах, отравлении стафилококковым энтеротоксином использование энтеросорбентов показано с целью купирования диарейного синдрома [4]. Энтеросорбенты рекомендуют назначать уже на догоспитальном этапе, не дожидаясь этиологического подтверждения диагноза [5]. При этом может быть достигнуто более легкое течение заболевания и быстрое выздоровление по сравнению с традиционными схемами лечения. Но энтеросорбенты в большинстве своем не отличаются селективностью по отношению к конкретным патологическим объектам, что зачастую сказывается на эффективности их применения. Поэтому в настоящее время активно развивается направление, связанное с разработкой селективных энтеросорбционных препаратов со специфическими свойствами, в том числе антитоксической направленности [6].

Ранее сообщалось о результатах экспериментов по конструированию специфического энтеросорбента против холеры, оказывающего нейтрализующее действие в отношении энтеротоксина холерного вибриона [7]. Антитоксическая селективность экспериментального противохолерного препарата обусловлена наличием на поверхности хитозановой матрицы молекул антитоксических иммуноглобулинов, выделенных из иммунной сыворотки крови кроликов-продуцентов, иммунизированных холерным токсином.

Неотъемлемой частью биотехнологической схемы изготовления иммуноэнтеросорбента является контроль токсиннейтрализующей активности его компонентов и готового экспериментального препарата в целом. Для постановки контрольных тестов применяется метод кожной пробы по Крейгу, считающийся «золотым стандартом» определения активности холерного токсина. При всех своих преимуществах – высокой чувствительности и специфичности – данный метод имеет существенные недостатки: длительность анализа (не менее 5–7 сут. с учетом предварительного титрования токсина), использование дорогостоящих биомоделей, потенциальная возможность аллергизации персонала при обработке животных. Не остается без внимания и этическая сторона использования методов *in vivo*, диктующая необходимость гуманизации экспериментов и замены млекопитающих – традиционных лабораторных животных менее развитыми живыми объектами. Альтернативные методы предполагают использование микроорганизмов, культуры клеток или тканей, растительных объектов, а также компьютерных и математических моделей, физико-химических и иммунохимических систем [8, 9]. В литературе имеются сообщения о применении иммуноферментного анализа с использованием GM1-ганглиозидов (GM1-ИФА) для определения *in vitro* активности холерного токсина штамма *V. cholerae* 569B [10]. Группой авторов был сконструирован иммуносенсор с применением наночастиц с золотым покрытием для определения хо-

лерного вибриона [11]. ИФА является одним из наиболее чувствительных и удобных методов иммуноанализа, однако его недостатками являются применение токсичных, канцерогенных хромогенов и необходимость использования аппаратуры для учета результатов. Указанные недостатки обусловили необходимость совершенствования методических подходов к определению активности полуфабриката и готового препарата противохолерного энтеросорбента с использованием безынструментальных тест-систем на основе неферментных диагностикумов.

Целью исследований являлось определение уровня токсиннейтрализующей активности специфических кроличьих иммуноглобулинов и экспериментального противохолерного иммуноэнтеросорбционного препарата в непрямом дот-иммуноанализе с использованием диагностикума на основе наночастиц коллоидного золота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали антитоксические кроличьи иммуноглобулины (8 образцов) и экспериментальные серии противохолерного иммуноэнтеросорбента (8 образцов).

Определение токсиннейтрализующей активности антитоксических иммуноглобулинов и энтеросорбента проводили *in vivo* по Крейгу на взрослых кроликах [12] и *in vitro* в непрямом дот-иммуноанализе (ДИА) с использованием экспериментального конъюгата на основе наночастиц коллоидного золота и белка *A Staphylococcus aureus*.

Для постановки кожной пробы по Крейгу использовали светло-серых кроликов породы шиншилла массой 2,5–3,0 кг. В качестве антигена использовали холерный токсин, содержащий от 2 до 32 000 кожных доз. Содержание токсина в одной кожной дозе соответствовало 15 мкг/мл (стандартный образец предприятия «Тест-токсин холерный» сер. 01-09-13).

Для определения токсиннейтрализующей активности экспериментальных серий энтеросорбент разводили в 0,9%-м растворе натрия хлорида до концентрации 10 %, затем готовили ряд последовательных двукратных разведений с 1:200 до 1:12800. К 0,2 мл каждого разведения экспериментального энтеросорбента добавляли 0,2 мл рабочего разведения холерного токсина. Смеси инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 ± 1 °C, после чего центрифугировали при 8 тыс. об/мин в течение 10 мин. Супернатант декантировали и вводили внутрикожно кроликам с предварительно депилированной кожей в боковые области параллельно линии позвоночника с интервалами в 3 см между точками укола в количестве 50 мкл. Кроликам контрольной группы аналогично вводили 2 кожные дозы холерного токсина в том же объеме 0,9%-го раствора натрия хлорида.

Учет реакции проводили через 18–20 ч. За титр токсиннейтрализующей активности специфического энтеросорбента принимали последнее разведение

исследуемого образца в реакционной смеси с холерным токсином, где не наблюдали кожной реакции в виде папул и зоны некроза или имела место папула менее 5 мм.

Выявлено, что титры активности экспериментальных серий специфического энтеросорбента и исходных иммуноглобулинов, входящих в состав сконструированного препарата, соответствовали значениям от 1:16 000 до 1:24 000 и 1:10 000 и 1:16 000 соответственно.

Полученные результаты являлись исходными значениями для определения содержания антитоксических единиц (АЕ/мл) в специфическом препарате.

Для определения АЕ/мл в пробирках готовили разведения антитоксического энтеросорбента в 0,9%-м растворе натрия хлорида, содержащие 80, 60, 40, 30 и 20 АЕ в 1 мл. По 0,2 мл каждого разведения энтеросорбента переносили в пробирки и добавляли по 0,2 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида и по 0,4 мл из разведения холерного токсина, содержащего 20 опытных доз/мл, получая содержание в сыворотке 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5 АЕ. Образцы выдерживали при температуре 37 ± 1 °С в течение 30 мин. После инкубации по 0,1 мл каждого разведения вводили внутрикожно двум кроликам начиная с 2 АЕ. Учет реакции проводили через 18–20 ч, регистрируя наличие или отсутствие папул на месте введения смеси испытуемого материала и токсина.

Для проведения непрямого ДИА с неферментным диагностикумом на основе белка А и наночастиц коллоидного золота использовали общепринятую методику [13] с модификациями Л. А. Дыкмана с соавт. [14]. В качестве конъюгатов использовали экспериментальный диагностикум (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), представляющий собой гидрозоль золота со средним размером частиц 15–17 нм, сорбционно связанный со стафилококковым белком А и стабилизированный 0,5%-м раствором ПЭГ-20000 [15].

В качестве твердой фазы использовали нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) Millipore (0,45 мкм), которую сенсibilизировали холерным тест-токсином в концентрации 20 мкг/мл. Мембрану подсушивали в течение 2 ч при 37 °С. Образцы антитоксических иммуноглобулинов разводили последовательно двукратно с 1/50 в 0,01 М ФСБ pH 7,2 и наносили на НЦМ аликвотами по 2,0 мкл в виде последовательного ряда точек.

Пробоподготовка противохолерного иммуноэнтеросорбента, который представляет собой нерастворимый в воде аморфный белый порошок, заключалась в предварительном разведении препарата до 10 % концентрации (экспериментально обоснованное значение) в 0,01 М растворе фосфатного буфера (ФСБ) pH 7,2.

Образцы энтеросорбента подвергали тщательной гомогенизации на вортексе и делали последовательные двукратные разведения в микротитровальных планшетах, начиная с 1/50. Планшеты с разведениями помещали на лабораторный шейкер и при посто-

янных колебательных движениях (150/1 мин) наносили исследуемые образцы на сенсibilизированную НЦМ аликвотами по 2,0 мкл в виде последовательного ряда точек. Далее для блокировки свободных сайтов связывания мембрану погружали в 3%-й раствор бычьего сывороточного альбумина на 15 мин при 20 °С. В качестве отрицательного контроля использовали иммуноглобулины нормальные кроличьи. Мембраны выдерживали до полного высушивания при 37 °С. После инкубации и промывки мембраны с нанесенными образцами помещали в пакет-камеры и добавляли не менее 400 мкл конъюгата на основе белка А и наночастиц коллоидного золота. По истечении 1–3 ч учитывали результаты ДИА. При необходимости проводили процедуру усиления цветового сигнала, для чего мембраны погружали в раствор физического проявителя, состоящего из 0,5%-го раствора лимонной кислоты, 0,2%-го раствора метола и 0,2%-го раствора нитрата серебра. Проявитель готовили непосредственно перед использованием. После обработки НЦ мембрану промывали водой деионизованной и подсушивали при температуре 20 °С.

Учет результатов проводили визуально, принимая за титр активности специфического иммуноэнтеросорбента наибольшее разведение образца, при котором в результате реакции с конъюгатом регистрировали четко различимое красное пятно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биотехнологическая схема изготовления экспериментального противохолерного энтеросорбционного препарата предполагает проведение контрольных исследований по определению антитоксической активности полученных антитоксических кроличьих иммуноглобулинов – активного компонента иммуноэнтеросорбента и готового препарата. В рамках настоящего исследования были усовершенствованы методические подходы к определению уровня активности полуфабрикатов и готового препарата в непрямом варианте ДИА с использованием экспериментального неферментного диагностикума на основе белка А *S. aureus* и наночастиц коллоидного золота со средним размером 15–17 нм. Одним из способов повышения чувствительности, информативности и экспрессности иммуноанализов является использование наноматериалов различной природы [16]. Наночастицы коллоидного золота в последнее десятилетие весьма востребованы в мембранных тестах вместо традиционных ферментных меток, что обусловлено интенсивной красной окраской золотосодержащего маркера дает и возможностью визуальной оценки результатов иммунохимической реакции [17, 18]. По данным литературы, конъюгаты с КЗ превосходят таковые с изотопными, флуоресцентными и ферментными метками по чувствительности, стабильности, простоте выполнения анализа и экономичности [19]. Белок А находит широкое распространение в иммуноанализе из-за своей способ-

ности специфически взаимодействовать с Fc-фрагментами иммуноглобулинов сыворотки крови животных, что позволяет выявлять специфические антитела [20]. Немаловажно, что белок А является универсальным компонентом, заменяющим антивидовые иммуноглобулины в непрямом ДИА.

В ходе работы в каждой пробе по Крейгу был определен уровень активности исходных компонентов энтеросорбента – антитоксических иммуноглобулинов, выделенных из антитоксической сыворотки кроликов и экспериментального препарата. Установлено, что активность исходных антитоксических иммуноглобулинов, определенная в АЕ/мл, составила от 7600 до 11 500, а активность иммуносорбента соответствовала значениям от 12 500 до 20 500 АЕ/мл (таблица 1).

Таблица 1. Токсиннейтрализующая активность исходных антитоксических иммуноглобулинов и экспериментальных серий антитоксического противохолерного энтеросорбента в кожной пробе по Крейгу

Table 1. Toxin-neutralizing activity of initial antitoxic immunoglobulins and experimental series of antitoxic anticholera enterosorbent in Craig dermal

№ серии энтеросорбента № series of enterosorbent	Активность исходных иммуноглобулинов, АЕ/мл Activity of initial immunoglobulins, AU/ml	Активность специфического энтеросорбента, АЕ/мл Activity of specific enterosorbent, AU/ml
01	10 500	14 500
02	11 500	18 000
03	10 500	20 500
04	9400	18 500
05	10 500	14 500
06	7600	18 500
07	7600	12 500
08	7600	12 500

При тестировании противохолерного энтеросорбента в непрямом ДИА уровень активности регистрировали в титрах от 1:6400 до 1:25 600 (рисунок 1). Специфичность теста подтверждена отрицательными результатами ДИА с нормальными кроличьими иммуноглобулинами (отрицательный контроль).

Для выявления корреляции результатов ДИА и кожной пробы по Крейгу был проведен сравнительный анализ результатов определения в указанных тестах активности экспериментальных серий специфического энтеросорбента (таблица 2), а также экспериментальных серий специфических иммуноглобулинов серий, входящих в состав энтеросорбционного препарата (таблица 3). Коэффициент корреляции составил $r=0,93$ и $r=0,97$ соответственно, что позволяет рекомендовать использование непрямого ДИА как альтернативного метода пробы по

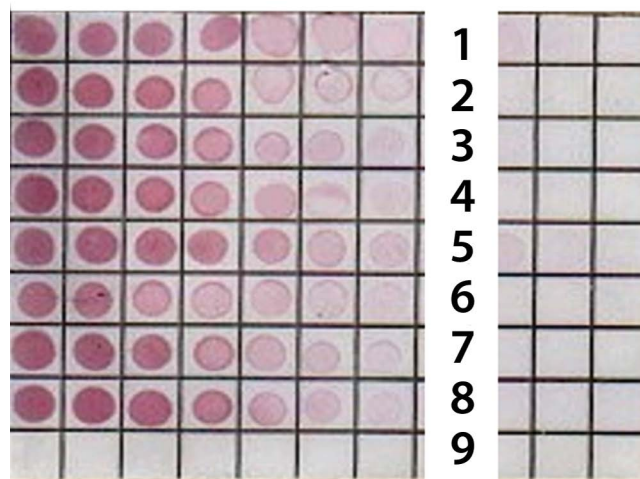


Рисунок 1. Результаты определения уровня активности противохолерного энтеросорбента в непрямом дот-иммуноанализе.

1–8 ряды – двукратные разведения энтеросорбента серий 01-08 с 1:100; титр 1:6400–1:25 600; 9 ряд – иммуноглобулины нормальные кроличьи (отрицательный контроль)

Figure 1. The results of determination of activity level of anticholera enterosorbent in indirect dot-immunoanalysis.

1–8 ranks – double dilutions of enterosorbent 01-08 series from 1:100; titer 1:6400–1:25600; 9 rank – standard rabbit immunoglobulins (negative control)

Крейгу для контроля антитоксической активности специфических иммуноглобулинов и специфического энтеросорбента.

Таблица 2. Специфическая активность экспериментального антитоксического энтеросорбента в тестах *in vivo* (кожная проба по Крейгу) и *in vitro* (непрямой дот-иммуноанализ)

Table 2. Specific activity of experimental antitoxic enterosorbent in tests *in vivo* (Craig dermal test) and *in vitro* (indirect dot-immunoanalysis)

№ серии антитоксического энтеросорбента № series of antitoxic enterosorbent	Специфическая активность, АЕ/мл Specific activity, AU/ml	Титр специфических антител в ДИА, реципрокный титр Titer of specific antibodies in DIA, reciprocal titer
01	14 500	25 600
02	18 000	12 800
03	20 500	12 800
04	18 500	12 800
05	14 500	25 600
06	18 500	6400
07	12 500	12 800
08	12 500	12 800
Средняя геометрическая титра: Geometric mean titer:	16 714	15 542

Таблица 3. Специфическая активность экспериментальных серий антитоксических иммуноглобулинов в тестах *in vivo* (кожная проба по Крейгу) и *in vitro* (непрямой дот-иммуноанализ)

Table 3. Specific activity of experimental antitoxic immunoglobulins in tests *in vivo* (Craig dermal test) and *in vitro* (indirect dot-immunoanalysis)

№ серии специфических иммуноглобулинов № series of antitoxic enterosorbent	Специфическая активность, АЕ/мл Specific activity, AU/ml	Титр специфических антител в ДИА, реципрокный титр Titer of specific antibodies in DIA, reciprocal titer
001	10 500	12 800
002	11 500	12 800
003	10 500	6400
004	9400	6400
005	10 500	12 800
006	7600	12 800
007	7600	6400
008	7600	6400
Средняя геометрическая титра: Geometric mean titer:	9400	9600

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные методические подходы с применением диагностикума на основе белка *A. S. aureus* и наночастиц коллоидного золота могут быть использованы для определения уровня активности антитоксических иммуноглобулинов и экспериментального иммуноэнтросорбента на этапах контроля при изготовлении специфического энтеросорбционного препарата против холеры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Куриленко М.П., Пичурина Н.Л., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Иванова С.М., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Прогноз по холере на 2019 г. на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(1):64–73. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-64-73.
2. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Левченко Д.А., Янович Е.Г., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И., Подойницына О.А. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(1):43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
3. Учайкин В.Ф., Новокшенов А.А., Соколова Н.В. Энтеросорбция – эффективный метод этиопатогенетической терапии острых кишечных инфекций. *Детские инфекции*. 2005;(3):39–43.
4. Захаренко С.М. Энтеросорбция в практике инфекциониста. *Русский медицинский журнал*. 2010;18(30):1829–1834.
5. Ратникова Л.И., Пермитина М.И., Попилов А.Н. Эффективность энтеросорбентов при острых кишечных инфекциях. *Врач*. 2007;(7):36–37.

6. Кожевникова Г.М., Ющук Н.Д., Бахтина Ю.А. Патогенетическая терапия острых кишечных инфекций. *Медицина критических состояний. Инфекции*. 2004;(6):3–6.
7. Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Кириллова Т.Ю., Плотиных И.А., Никифоров А.К., Адамов А.К. Антитоксическая активность противохолерного энтеросорбционного препарата в опытах *in vivo* антитоксическая активность противохолерного энтеросорбционного препарата в опытах *in vivo*. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018;14(4):48–53.
8. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Профиль; 2010. 358 с.
9. Тертон М., Бангхем Д.Р., Колкотт К.А. Новые методы иммуноанализа. М.: Мир; 1991. 280 с.
10. Дуракова О.С., Громова О.В., Гаева А.В., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Клокова О.Д., Волох О.А. Экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток СНО-К1 для определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(4):113–116. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116.
11. Rashidani J., Eskandari K., Ranjbar R. Application of gold core-shell magnetic nanoparticles immunosensor for detection of vibrio cholera. *Journal of Applied Biotechnology Report*. 2021;(8):71–75.
12. Craig J. Preparation of the vascular permeability factor of *V. cholera*. *J. Bacteriol.* 1966;92(3):793–795.
13. Большакова Е.А. ИФА и ПЦР – современные методы клинической лабораторной диагностики. *Поликлиника*. 2012;(2):16–22.
14. Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы. *АСТА NATURAE*. 2011;3,2(9):16–38.
15. Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Галкина М.В., Краснов Я.М. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;1(103):63–66.
16. Nishat S., Awan F.R., Bajwa S.Z. Nanoparticle-based point of care immunoassays for *in vitro* biomedical diagnostics. *Analytical Sciences*. 2019;(35)2:123–131.
17. Загоскина Т.Ю., Чапоргина Е.Л., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Долгова Т.М., Гаврилова О.В., Тайкова Т.С., Балахонов С.В. Дот-иммуноанализ с использованием антител, меченных наночастицами коллоидного золота, для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;(4)31:31–35. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-31-35.
18. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Азаев М.Ш., Филатов П.В. Оптимизация условий проявления результатов дот-иммуноанализа в автономном наборе для выявления ортопоксвирусов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2019;24(2):77–83. DOI: 10.18821/1560-9529-2019-24-2-77-83.
19. Vera-Cabrera L., Rendon A., Diaz-Rodriguez M. Dot blot assay for detection of anti-diacyltrehalose antibodies in tuberculous patients. *Clin Diagn. Lab. Immunol.* 1999;6:686–689.
20. Ghitescu L., Bendayan M. Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1990;(38)11:1523–1530.

REFERENCES

1. Moskvitina E. A., Yanovich E. G., Kruglikov V. D., Titova S. V., Kurilenko M. L., Pichurina N. L., Vodop'yanov A. S., Levchenko D. A., Ivanova S. M., Vodop'yanov S. O., Oleynikov I. P. Cholera Forecast for the Year 2019 Based on Assessment of Epidemiological Situation Around the World, Across CIS and Russia in 2009–2018. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(1):64–73. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-64-73.
2. Noskov A. K., Kruglikov V. D., Moskvitina E. A., Monakhova E. V., Levchenko D. A., Yanovich E. G., Vodop'yanov A. S., Pisanov R. V., Nepomnyashchaya N. B., Ezhova M. I., Podoinitsyna O. A. Charac-

- teristics of the Epidemiological Situation on Cholera in the World and in the Russian Federation in 2020 and Forecast for 2021. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(1):43–51. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
3. Uchaikin V. F., Novokshonov A. A., Sokolova N. V. Enterosorbition is an effective method of etiopathogenetic therapy of acute intestinal infections. *Children infections*. 2005;(3):39–43. (In Russ.)
 4. Zakharenko S. M. Enterosorption in the practice of an infectious disease specialist. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2010;18(30):1829–1834. (In Russ.)
 5. Ratnikova L. I., Permitina M. I., Popilov A. N. The effectiveness of enterosorbents in acute intestinal infections. *Vrach*. 2007;(7):36–37. (In Russ.)
 6. Kozhevnikova G. M., Yushchuk N. D., Bakhtina Yu. A. Pathogenetic therapy of acute intestinal infections. *Meditsina kriticheskikh sostoyaniy. Infektsii*. 2004;(6):3–6. (In Russ.)
 7. Ovchinnikova M. V., Abramova E. G., Kirillova T. Yu., Plotnikov I. A., Nikiforov A. K., Adamov A. K. Antitoxic activity of an experimental anticholera enterosorption drug in vivo. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu. A. Ovchinnikova*. 2018;14(4):48–53. (In Russ.)
 8. Karkishchenko N. N., Grachev S. V. Guide to laboratory animals and alternative models for biomedical purposes. Moscow: Profil'; 2010. 358 p. (In Russ.)
 9. Terton M., Banghem D. R., Kolkott K. A. New immunoassay methods. Moscow: Mir; 1991. 280 p. (In Russ.)
 10. Durakova O. S., Gromova O. V., Gaeva A. V., Generalov S. V., Livanova L. F., Klokova O. D., Volokh O. A. Experimental Substantiation of the Possibility to Use Finite Cell Line CHO-K1 for Determination of Specific Activity of Components of Chemical Cholera Vaccine. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(4):113–116. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116.
 11. Rashidiani J., Eskandari K., Ranjbar R. Application of gold core-shell magnetic nanoparticles immunosensor for detection of vibrio cholera. *Journal of Applied Biotechnology Report*. 2021;(8):71–75.
 12. Craig J. Preparation of the vascular permeability factor of V. cholera. *J. Bacteriol.* 1966;92(3):793–795.
 13. Bol'shakova E. A. ELISA and PCR - modern methods of clinical chesky laboratory diagnostics. *Poliklinika*. 2012;(2):16–22. (In Russ.)
 14. Dykman L. A., Khlebtsov N. G. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent achievements and prospects. *ACTA NATURAE*. 2011;3,2(9):16–38. (In Russ.)
 15. Sharapova N. A., Abramova E. G., Nikiforov A. K., Kireev M. N., Savitskaya L. V., Minaeva L. N., Mikheeva T. A., Galkina M. V., Krasnov Ja. M. Determination of the activity of the anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin *in vitro* in the dot immunoassay. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;1(103):63–66. (In Russ.)
 16. Nishat S., Awan F. R., Bajwa S. Z. Nanoparticle-based point of care immunoassays for in vitro biomedical diagnostics. *Analytical Sciences*. 2019;(35)2:123–131.
 17. Zagoskina T. Yu., Chaporgina E. A., Markov E. Yu., Popova Yu. O., Dolgova T. M., Gavrilova O. V., Taikova T. S., Balakhonov S. V. Dot-immunoassay using gold nanoparticle marked colloid gold for the detection of botulinic toxin in clinical material and food products. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;(4):31–35. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-31-35. (In Russ.)
 18. Poltavchenko A. G., Ersh A. V., Azaev M. Sh., Filatov P. V. Optimization of the conditions for the development of the results of the dot-immunoassay in an autonomous kit for the detection of orthopoxviruses. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2019;24(2):77–83. (In Russ.) DOI: 10.18821/1560-9529-2019-24-2-77-83.
 19. Vera-Cabrera L., Rendon A., Diaz-Rodriguez M. Dot blot assay for detection of antidiacyltrehalose antibodies in tuberculous patients. *Clin Diagn. Lab. Immunol.* 1999;6:686–689.
 20. Ghitescu L., Bendayan M. Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1990;(38)11:1523–1530.