

На правах рукописи

Виконт

Маннесон Виктор Эммануэль Нии Одотей Ньюмода

**СОЗДАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ
АНТИТЕЛ К ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИД-АНТИГЕНУ *YERSINIA
PSEUDOTUBERCULOSIS* ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ
ИЕРСИНИЙ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

Научный руководитель:	кандидат биологических наук, доцент Иващенко Сергей Владимирович
Официальные оппоненты:	Галиуллин Альберт Камирович, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии
	Генералов Сергей Вячеславович, кандидат биологических наук, ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов
Ведущая организация:	ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»

Защита диссертации состоится « » 2023 года в ⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.01 при ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловский университет и на сайте www.vavilovsar.ru

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3, ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат диссертации разослан « » 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Возбудители кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза поражают людей и животных. Высеваемость кишечных иерсиний у свиней в отдельных странах Европы составляет до 27% (Метод. рек. "Псевдотуберкулез...", 2004), Африки – до 20% (Jibrin M.S. et al., 2013), а в России – более 10% (Метод. рек. "Псевдотуберкулез...", 2004). Для псевдотуберкулёзного микроба данный показатель имеет значение до 18% в Европе (Martinez P.O. et al., 2010) и до 9% в Африке (Jibrin M.S. et al., 2013).

Бактериологический метод, используемый при диагностике кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза, имеет высокую трудоёмкость, длительные сроки выделения возбудителей, низкую эффективность, большое количество ложных выделений иерсиниозных культур, что связано со значительной обсеменённостью патологического материала кишечной микрофлорой и несовершенством методов выделения (Fredriksson-Ahoma M., et al., 2009; Laukkanen R. et al., 2010; Liang J., et al., 2012; Van Damme I. et al., 2014). Серологические методы диагностики значительно повышают эффективность выделения иерсиний.

Существующие диагностические препараты позволяют обнаруживать только отдельные сероварианты или виды *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Однако исследования ряда учёных указывают на возможность одновременной циркуляции обоих возбудителей в кишечнике у 10% свиней (Fredriksson-Ahoma M., et al., 2009; Martinez P.O. et al., 2009; Jibrin M.S. et al., 2013). При этом востребованными являются диагностические препараты, позволяющие одновременно проводить индикацию *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Такие препараты создаются на основе гипериммунных сывороток с родовой специфичностью. Гипериммунные сыворотки получают в результате многократной иммунизации животных-продуцентов смесью антигена с адьювантом.

Для получения сывороток крови с родовой специфичностью можно использовать диметилсульфоксид-антиген (ДА). Впервые данный антиген был изучен у *Mycobacterium tuberculosis* и *Y. enterocolitica* (Хаджу А. и др. 2014; Elder A. et al., 2013), а также получены антитела к нему (Иващенко С.В. и др., 2015; Хаджу А. и др. 2015). Антитела, полученные к ДА *Y. enterocolitica*, позволили создать на их основе две диагностические тест-системы (Хаджу А. и др. 2015, 2016), успешные испытания которых показали перспективность дальнейших исследований в данной области.

В последнее время популярность в качестве адьювантов приобретают синтетические полиэлектролиты. Простота химического синтеза, растворимость в воде, способность образовывать конъюгаты с частицами антигенов, открыли перспективы их использования в качестве адьювантов (Петров Р.В. и др., 2011; Исаенко Е.Ю. и др., 2013). Одним из представителей данной группы химических соединений является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ). Возможность применения ПААГ в качестве адьюванта для получения гипериммунных сывороток крови впервые была изучена при иммунизации кроликов липополисахаридом (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis* (Kuznetsova V.S. et al., 2020), а также

дезинтегрированными мембранами *Y. pseudotuberculosis* и *Xanthomonas campestris* (Щербаков А.А. и др., 2017; Ivashchenko S.V. et al., 2020). Данные эксперименты показали перспективность использования ПААГ для гипериммунизаций.

Множество публикаций о стимулирующем действии золотых наночастиц (ЗНЧ) на антителогенез делает актуальным проведение опытов по изучению возможности применения ЗНЧ в качестве альтернативы масляным адьювантам при гипериммунизации кроликов ДА иерсиний (Dykman, L.A., 2020).

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в России имеется лишь одна псевдотуберкулёзная коммерческая тест-система, ориентированная на определение 1 сероварианта возбудителя, и отсутствуют тест-системы для индикации *Y. enterocolitica*.

Разработка экспериментальных образцов иммуноферментных тест-систем для выявления энтеропатогенных иерсиний и антител к ним достаточно активно проводится в течение последних 40 лет. Однако исследования, направленные на разработку тест-систем, способных одновременно определять наличие *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* в исследуемом материале, редки, а созданные тест-системы не адаптированы для ветеринарии.

Извлечение антигенов из микробных клеток при помощи диметилсульфоксида (ДМСО) было проведено на туберкулёзной палочке и возбудителе кишечного иерсиниоза. Последний микроб близок по антигенному составу к *Y. pseudotuberculosis*. Однако абсолютной идентичности между антигенами данных микробов нет. Об этом свидетельствует отсутствие перекрёстных серологических взаимодействий между *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* по многим белковым и полисахаридным антигенам.

Возможность использования ПААГ в качестве адьюванта при гипериммунизациях животных ранее была изучена в опытах с дезинтегрированными мембранами *Y. pseudotuberculosis* и *X. campestris* (Щербаков А.А. и др., 2017; Ivashchenko S.V. et al., 2020). Однако взаимодействие ПААГ в комплексе с ДА не изучалось.

Золотые наночастицы в качестве адьюванта при гипериммунизации животных ДА иерсиний ранее не применялось. Хотя 4-6 кратные иммунизации белых мышей и кроликов другими антигенами в комплексе с ЗНЧ проводились.

Цель – создание родоспецифической иммуноферментной тест-систем для индикации возбудителей псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза у сельскохозяйственных животных.

Основные задачи проведённых исследований:

1. Выделить ДМСО-фракцию *Y. pseudotuberculosis* и изучить её антигенные свойства.

2. Получить гипериммунную сыворотку крови к ДА псевдотуберкулёзного микроба и провести оценку её антительной активности и специфичности в сравнении с аналогичной кишечной иерсиниозной сывороткой.

3. Установить возможность использования ПААГ в качестве адьюванта при гипериммунизации кроликов и морских свинок ДА *Y. pseudotuberculosis*.

4. Изучить возможность использования для гипериммунизации кроликов комплекса ДА *Y. enterocolitica* и ЗНЧ.

5. Создать иммуноферментную тест-систему на основе гипериммунных сывороток, полученных в результате иммунизации лабораторных животных комплексом ДА с ПААГ.

6. Провести испытания созданной тест-системы на возможность индикации энтеропатогенных иерсиний в фекалиях сельскохозяйственных животных после их "холодового обогащения".

Научная новизна работы. Впервые выделена ДМСО-фракция *Y. pseudotuberculosis* и изучены её антигенные свойства.

Получена гипериммунная сыворотка крови к ДА псевдотуберкулёзного микроба и проведена оценка её антительной активности и специфичности в сравнении с аналогичной кишечной иерсиниозной сывороткой.

Установлена возможность использования ПААГ в качестве адьюванта при гипериммунизации кроликов и морских свинок ДА *Y. pseudotuberculosis*.

Изучена возможность использования для гипериммунизации кроликов комплекса ДА *Y. enterocolitica* и ЗНЧ.

Создана псевдотуберкулёзная иммуноферментная тест-система на основе гипериммунных сывороток, полученных после иммунизации лабораторных животных ДА *Y. pseudotuberculosis* в комплексе с ПААГ.

Созданная иммуноферментная тест-система была успешно испытана на сельскохозяйственных животных.

Теоретическое и практическое значение работы. Проведённые исследования дополняют теоретическую базу по изучению полиэлектrolитных адьювантов и бактериальных антигенов. Показана возможность совместного использования ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ для получения диагностических гипериммунных иерсиниозных сывороток. Изучена возможность использования для гипериммунизации кроликов комплекса ДА *Y. enterocolitica* и ЗНЧ. Созданная иммуноферментная тест-система повышает эффективность диагностики кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза. Разработана инструкция по применению созданной иммуноферментной тест-системы. Результаты диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по дисциплинам "Ветеринарная биотехнология", "Основы иммунологии и получение иммунобиологических препаратов", а также написании дипломных работ в ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Методология и методы исследования. Методологической базой исследований послужили труды отечественных и зарубежных ученых, посвящённые вопросам распространения и лабораторной диагностики кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза, а также создания иммунологических диагностических препаратов для индикации данных инфекций. Научная работа проводилась с использованием

комплексного анализа и системного подхода. Автором были применены: теоретико-методологический анализ литературных источников и эмпирические методы исследования. Совокупность использованных методов позволила обеспечить достоверность приведённых в работе выводов и результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гипериммунные сыворотки крови кроликов, полученные к ДА *Y. pseudotuberculosis*, проявляют более высокую антительную активность, чем аналогичные кишечной иерсиниозные сыворотки.

2. Использование ПААГ в комплексе с ДА *Y. pseudotuberculosis* позволяет получать высокоактивные гипериммунные иерсиниозные сыворотки крови кроликов и морских свинок.

3. Золотые наночастицы не обеспечивают достаточной стимуляции синтеза антител к ДА *Y. enterocolitica* при гипериммунизации кроликов, но могут быть использованы для двукратной иммунизации животных.

4. Гипериммунные сыворотки, полученные после иммунизации кроликов и морских свинок комплексом ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ, могут быть использованы в иммуноферментном анализе для индикации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*.

5. Созданная на основе гипериммунных сывороток к ДА *Y. pseudotuberculosis* иммуноферментная тест-система позволяет выявлять псевдотуберкулёзного и кишечной иерсиниозного микробов в фекалиях сельскохозяйственных животных после "холодового обогащения".

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы представлены на: Междунар. науч.-практич. конф. "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий" (Саратов: СГАУ 2017; 2018), Междунар. науч.-практич. конф. "Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии" (Саратов: СГАУ 2017), Междунар. конф. "Международная школа молодых учёных "Научная волна" (Саратов: СГАУ 2017; 2018), VI Междунар. конф. "Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса" (Михайловск: ФГБНУ "Северо-Кавказский ФНАЦ" 2018), Междунар. науч.-практич. конф. по итогам науч.-исслед. и производ. работы студентов (Саратов: СГАУ 2019), II International Conference "AGRITECH-II-2019: Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies" (Красноярск 2019), XIII Междунар. науч.-практич. конф. "Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса", посв. 90-летию ДГТУ (РИСХМ) (Ростов-на-Дону: ДГТУ 2020), Национ. науч.-практич. конф. "Зыкинские чтения" посв. памяти д.м.н., проф. Зыкина Леонида Фёдоровича (Саратов: СГАУ 2020; 2021), Конф. проф.-преподават. состава и аспирантов по итогам науч.-исслед., учебно-методич. и воспитательной работы (Саратов: СГАУ 2022).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 в изданиях из международной базы данных.

Личный вклад соискателя состоит в подготовке и проведении экспериментальных исследований на всех этапах диссертационной работы, интерпретации полученных результатов, участии в подготовке публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 129 страницах и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также из заключения, выводов, практических предложений, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, приложения. Работа иллюстрирована 2 рисунками и 21 таблицей. Список литературы включает 251 источник, из которых 179 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена на кафедре "Микробиология и биотехнология" ФГБОУ ВО Вавиловский университет в период с 2017 по 2022 годы.

При проведении исследований нами были использованы музейные штаммы бактерий, полученные из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб": *Y. pseudotuberculosis* I, III, IV, V (O:1, O:3, O:4, O:5 серовариантов), *Y. enterocolitica* 66-82, 82-82, 295-82, 383 (O:3, O:5, O:6, O:9 серовариантов), *Escherichia coli* 4295, *Proteus vulgaris* 19, *Salmonella typhimurium* 1626, а также штаммы, ранее выделенные от животных сотрудниками кафедры: *Y. pseudotuberculosis* 40, 67 (O:3 сероварианта) и *Y. enterocolitica* 12, 58 (O:3 сероварианта) и единый бруцеллезный антиген (*Brucella abortus*). Для приготовления формализированных бактериальных взвесей использовали стеклянный стандарт мутности на 10 единиц. Иерсинии культивировали при температуре 26 °С 2 суток на мясопептонном агаре (МПА), а бактерий из других родов выращивали – при 37 °С сутки.

ДМСО-антиген получали из выращенных в S-форме на МПА и отмытых двухсуточных музейных культур иерсиний O:3 сероварианта. Отмытые микробные клетки использовали для приготовления "ацетонового порошка", который затем обрабатывали ДМСО. Полученный ДА освобождали от ДМСО диализом в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе и лиофильно высушивали.

Для определения соотношения белков и углеводов в ДА иерсиний использовали методы М.М. Bradford (1976), и фенольный метод (Dubois M. et al., 1956). Состав белковых фракций исследовался методом электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по U.K. Laemmli (1970). Визуализацию белков в геле проводили Кумасси синим R-250 (Merck, Германия). После разделения белков в электрофорезе проводили иммуноблоттинг по методу Н. Towbin et al. (1979). Разделение белков и изучение их антигенной активности были проведены в лаборатории холерных вакцин ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора. Полученные результаты были нам любезно предоставлены М.Н. Киреевым, кандидатом медицинских наук и ведущим научным сотрудником данной лаборатории.

Антигенную активность ДА определяли с помощью сывороток кишечной эшерихии (O:3, O:9) и псевдотуберкулёзной из наборов диагностических для РНГА производства ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, а также сывороток диагностических агглютинирующих кишечной эшерихии (O:3, O:9) и псевдотуберкулёзных (O:1, O:3) O-моновалентных кроличьих производства ФБУН НИИЭМ им. Пастера. Для определения специфичности ДА использовали эшерихиозные диагностические агглютинирующие ОК-поливалентные сыворотки производства АО "Биомед" им. И.И. Мечникова, сыворотку диагностическую агглютинирующую сальмонеллёзную адсорбированную поливалентную основных серогрупп А, В, С, D, Е производства ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, бруцеллёзную диагностическую поливалентную кроличью сыворотку для РА производства ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора.

Получение гипериммунных сывороток крови осуществляли иммунизацией 60 кроликов породы "Шиншилла" массой 2,5-3 кг и 10 морских свинок массой 0,4-0,5 кг. Подкожные иммунизации кроликов и морских свинок проводили вдоль спины в 3-4 точки в объёме 1 мл смеси ДА и адьюванта в соотношении 1:1. В качестве адьюванта использовали полный адьювант Фрейнда (ПАФ), ПААГ или ЗНЧ. Проводили 5 иммунизаций с интервалом в 2 недели. Перед очередной иммунизацией из ушной вены кролика брали кровь для исследования в объёме 5 мл. Завершающее взятие крови проводили через 2 недели после 5-й иммунизации. У морской свинки кровь брали однократно из сердца в процессе тотального обескровливания. Полученную сыворотку хранили замороженным виде.

Специфическую активность ДА и полученных гипериммунных сывороток определяли в непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА) на 96-луночных полистироловых микропланшетах, производства фирмы "Jet Biofil" (Китай) (Hornbeck P. et al., 2001).

Золотые наночастицы диаметром 15,2 нм и конъюгат ЗНЧ с ДА были любезно предоставлены Л.А. Дыкманом, доктором биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН (г. Саратов). ЗНЧ получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия по методу G. Frens (1973). Средний размер частиц контролировали спектрофотометрически и методом просвечивающей электронной микроскопии. Конъюгат ЗНЧ с ДА *Y. enterocolitica* получали простой физической адсорбцией.

В экспериментах с ЗНЧ использовали 36 беспородных белых мышей массой 20-22 г. Были иммунизированы 6 групп мышей (3 опытные и 3 контрольные). Препараты им вводили внутрибрюшинно двукратно с интервалом 10 дней в объёме 0,5 мл. Для иммунизации использовали ДА *Y. enterocolitica* в дозе по белку 25 мкг на животное. В качестве адьювантов использовали: ЗНЧ, ПАФ, ЗНЧ + ПАФ (опытные группы). Соотношение антигена и адьюванта в препарате составляло 1:1. Через 10 суток после последней иммунизации мышей декапитировали.

Определение дыхательной активности макрофагов проводили с использованием МТТ-теста, основанного на восстановлении клетками красителя нитротетразолевого синего в нерастворимый формазан (Bernas, T. et al., 2000).

Содержание интерферона- γ , интерлейкинов-1 β и 6 в сыворотке крови мышей определяли при помощи коммерческих иммуноферментных тест-систем производства АО "Вектор-Бест", г. Новосибирск.

Для лабораторного испытания созданной тест-системы фекалии свиней смешивали с фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) 1:10 и обсеменяли двухсуточными агаровыми культурами *Y. enterocolitica* или *Y. pseudotuberculosis* из расчёта получения микробной взвеси с содержанием 5×10^6 , 5×10^4 , 5×10^2 , 50 м.к./мл. По 0,5 мл полученных микробных взвесей с фекалиями высевалось в пробирки с 4,5 мл сред накопления: ФСБ и забуференной пептонной водой (1% ЗПВ). Исследование сред при помощи экспериментальной иммуноферментной тест-системы проводили на 3-и и 6-е сутки "холодового обогащения" посевов. Отобранные пробы обрабатывали формалином.

Все животные использованные в лабораторных опытах содержались в стационаре ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. При проведении экспериментов над животными руководствовались законом РФ от 1.01.1997 г "О защите животных от жестокого обращения" и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г).

Фекалии животных для исследования забирали из прямой кишки ватным тампоном в пробирку с ФСБ и помещали посевы в холодильник для накопления иерсиний. Высевы со среды накопления на чашки со средой Эндо проводили на 3-е и 6-е сутки петлём, предварительно подвергая высеваемый материал щелочной обработке. Для этого смешивали равные количества исследуемой пробы и 0,5%-го щелочного раствора в течение 4-х минут. Через двое суток инкубации при 26 °С изучали колонии, выросшие на среде Эндо.

Для идентификации иерсиний использовали микроскопию с окраской по методу Грама, культивирование на агаре Эндо, на средах Гисса с сахарами, среде с мочевиной и Микро-ЛА-Тест ЭНТЕРОтест 24 N фирмы "Erba Lachema". Серотипирование иерсиний проводили ориентировочной реакцией агглютинации (ОРА) с О-моновалентными кроличьими агглютинирующими кишечной иерсиниозными и псевдотуберкулёзными сыворотками производства ФБУН НИИЭМ им. Пастера. Вирулентность иерсиний выявляли в тестах аутоагглютинации, пигментсорбции, температурозависимой морфологии колоний по общепринятым методикам и с сывороткой диагностической к вирулентным иерсиниям производства ФБУН НИИЭМ им. Пастера.

Статистическую обработку цифровых значений результатов исследований проводили с помощью программы Statistica 6 (Statsoft Inc.), Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation). Вычисляли среднюю арифметическую и среднюю ошибку средней арифметической.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение ДА *Y. pseudotuberculosis* и сравнительная оценка антигенной активности ДА энтеропатогенных иерсиний

На первом этапе исследований нами был выделен ДА *Y. pseudotuberculosis* и проведена сравнительная оценка активности данного антигена с ранее полученным А. Хаджу и др., 2014 ДА *Y. enterocolitica* (Рисунок 1 и Таблица 1).

Соотношение белков и углеводов составило: для ДА *Y. pseudotuberculosis* – 30:1, а для ДА *Y. enterocolitica* – 10:1. В составе ДА *Y. pseudotuberculosis* и ДА *Y. enterocolitica* преобладают белки с молекулярными массами: 45, 38 и 17 кДа, однако в ДА *Y. pseudotuberculosis* наблюдается дополнительный белок 20 кДа. Содержание белка с молекулярной массой 17 кДа выше в ДА *Y. pseudotuberculosis* (Рисунок 1а).

Антигенной активностью в ДА *Y. pseudotuberculosis* обладали белки с молекулярными массами 45, 38, 32, 28 кДа. Однако наиболее яркая реакция была отмечена с белком массой 38 кДа (Рисунок 1б).

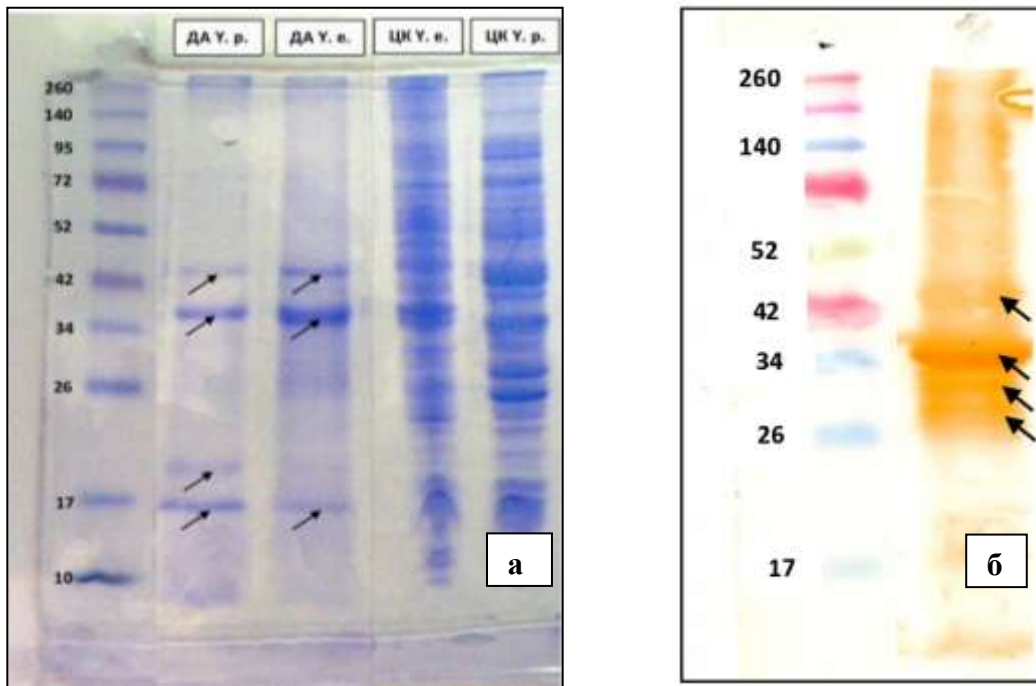


Рисунок 1 – Белковый состав ДА: а. Электрофорез белков ДА и цельных клеток (ЦК) энтеропатогенных иерсиний; б. Иммуноблоттинг белков ДА *Y. pseudotuberculosis* с сывороткой, полученной к ДА *Y. pseudotuberculosis*

Сравнительная оценка антигенной активности ДА *Y. pseudotuberculosis* и ДА *Y. enterocolitica* проводилась с помощью коммерческих диагностических сывороток в ИФА (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная оценка антигенной активности ДА кишечной иерсиниозной и псевдотуберкулёзной микробов

Диагностические сыворотки		Титры антител к ДА / двоичные логарифмы титров для n = 5			
		к ДА <i>Y. pseudotuberculosis</i>		к ДА <i>Y. enterocolitica</i>	
		титр	логарифм	титр	логарифм
Псевдотуберкулёзная для РНГА		1:25600	14,20±0,68	1:12800	13,22±0,89
Кишечноиерсиниозная О:3 для РНГА		1:12800	13,53±0,73	1:12800	13,47±0,82
Кишечноиерсиниозная О:9 для РНГА		1:12800	13,41±0,66	1:12800	13,64±0,70
Псевдотуберкулёзные для ОРА	О:1	1:50	5,58±0,43	1:50	5,51±0,34
	О:3	1:100	6,63±0,50	1:50	5,79±0,23
Кишечноиерсиниозные для ОРА	О:3	1:400	8,71±0,43	1:400	8,65±0,28
	О:9	1:400	8,41±0,28	1:400	8,54±0,51
Бруцелллёзная		1:400	8,83±0,59	1:3200	11,03±0,32
Сальмонелллёзная АВСДЕ		–	–	–	–
Эшерихиозная	ОКА	1:1600	10,27±0,39	1:800	9,27±0,64
	ОКВ	1:800	9,40±0,67	1:400	8,61±0,46
	ОКС	1:100	6,99±0,30	1:50	5,62±0,13
	ОКД	–	–	–	–
	ОКЕ	1:800	9,62±0,63	1:400	8,96±0,49

Примечание – "n" – количество кроликов в группе.

Было установлено, что ДА *Y. pseudotuberculosis* обладает большей антигенной активностью, чем ДА *Y. enterocolitica* (Таблица 1).

Получение гипериммунной сыворотки к ДА *Y. pseudotuberculosis* и сравнительная оценка антительной активности сывороток к ДА иерсиний

На втором этапе исследований нами была получена кроличья гипериммунная сыворотка к ДА *Y. pseudotuberculosis* и проведена сравнительная оценка антительной активности данной сыворотки с сывороткой к ДА *Y. enterocolitica* (Таблица 2).

Полученная нами к ДА *Y. pseudotuberculosis* гипериммунная сыворотка обладала большей антительной активностью (Таблица 2).

Таблица 2 – Антительная активность экспериментальных сывороток к ДА иерсиний

Использованные антигены		Титры антител сывороток / двоичные логарифмы титров для n = 10			
		псевдотуберкулёзной		кишечноиерсиниозной	
		титр	логарифм	титр	логарифм
ДА <i>Y. pseudotuberculosis</i>		1:819200	19,47±1,36	1:409600	18,68±0,80
ДА <i>Y. enterocolitica</i>		1:409600	18,66±1,22	1:409600	18,83±1,01
Клетки <i>Y. pseudo- tuberculosis</i>	O:1	1:51200	15,02±0,78	1:6400	12,49±0,83
	O:3	1:51200	15,48±1,14	1:12800	13,20±0,87
	O:4	1:12800	13,41±0,63	1:6400	12,75±0,76
	O:5	1:6400	12,53±0,89	1:12800	13,35±1,01
Клетки <i>Y. entero- colitica</i>	O:3	1:25600	14,27±0,59	1:25600	14,49±0,34
	O:5	1:25600	14,82±0,68	1:6400	12,46±0,74
	O:6	1:6400	12,73±0,77	1:12800	13,11±0,69
	O:9	1:25600	14,46±0,59	1:12800	13,46±0,83

Примечание – "n" – количество кроликов в группе.

По итогам первых двух этапов исследования для дальнейших экспериментов нами был выбран ДА псевдотуберкулёзного микроба, как наиболее активный.

Использование ПААГ в качестве адьюванта при гипериммунизации лабораторных животных ДА *Y. pseudotuberculosis*

На третьем этапе исследований нами была изучена возможность использования ПААГ в качестве адьюванта при гипериммунизации кроликов и морских свинок ДА *Y. pseudotuberculosis*. Для этого нами сначала была проведена иммунизация кроликов различными дозами ДА *Y. pseudotuberculosis* в комплексе с ПААГ. Всего было проведено 5 иммунизаций. В контрольных группах ПААГ заменяли физиологическим раствором (ФР). Полученные после каждой иммунизации сыворотки были исследованы в ИФА (Таблица 3).

Было установлено, что использование ПААГ в комбинации с ДА *Y. pseudotuberculosis* позволяет получать гипериммунную кроличью сыворотку крови с высоким титром специфических антител. Оптимальной иммунизирующей дозой для получения гипериммунной иерсиниозной сыворотки с использованием в качестве адьюванта ПААГ является доза 2 мг ДА *Y. pseudotuberculosis* на кролика (Таблица 3).

Таблица 3 – Иммунизация кроликов различными дозами ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ

Иммунизация	Титры антител сывороток / двоичные логарифмы титров для n = 5						
	Наличие адьюванта (ПААГ 1%)	Доза ДА, мг/кролика					
		0,2	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
1	ФР (контроль)	1:400/ 8,09±0,18	1:1600/ 10,77±0,39	1:1600/ 10,29±0,64	1:1600/ 10,18±0,32	1:3200/ 11,98±0,36	1:3200/ 11,85±0,72
	ПААГ	1:1600/ 10,65±0,59	1:3200/ 11,55±0,70	1:3200/ 11,26±0,65	1:3200/ 11,95±0,73	1:3200/ 11,03±0,50	1:3200/ 11,09±0,52
2	ФР (контроль)	1:1600/ 10,33±0,41	1:6400/ 12,42±0,75	1:6400/ 12,92±0,75	1:6400/ 12,99±0,71	1:12800/ 13,02±0,41	1:25600/ 14,58±1,09
	ПААГ	1:12800/ 13,88±0,75	1:25600/ 14,12±0,71	1:25600/ 14,41±0,70	1:25600/ 14,03±0,48	1:25600/ 14,59±1,16	1:25600/ 14,06±0,79
3	ФР (контроль)	1:3200/ 11,84±0,57	1:12800/ 13,48±0,69	1:25600/ 14,74±0,70	1:25600/ 14,20±0,78	1:51200/ 15,45±0,71	1:102400/ 16,82±0,82
	ПААГ	1:25600/ 14,02±0,78	1:51200/ 15,99±0,75	1:102400/ 16,05±0,97	1:102400/ 16,26±0,54	1:102400/ 16,77±0,62	1:102400/ 16,40±1,18
4	ФР (контроль)	1:6400/ 12,59±0,61	1:25600/ 14,06±0,54	1:25600/ 14,70±1,03	1:51200/ 15,97±0,76	1:102400/ 16,12±0,67	1:204800/ 17,57±1,09
	ПААГ	1:51200/ 15,68±0,50	1:102400/ 16,77±0,40	1:204800/ 17,98±0,54	1:204800/ 17,53±0,93	1:204800/ 17,66±0,77	1:204800/ 17,88±0,46
5	ФР (контроль)	1:6400/ 12,24±0,58	1:25600/ 14,62±0,96	1:51200/ 15,33±0,61	1:102400/ 16,55±1,13	1:204800/ 17,66±1,43	1:409600/ 18,25±1,40
	ПААГ	1:51200/ 15,63±0,85	1:204800/ 17,50±1,01	1:409600 / 18,95±0,79	1:409600/ 18,07±0,84	1:409600/ 18,48±1,01	1:409600/ 18,70±0,66

Примечание – "n" – количество кроликов в группе.

Полученная гипериммунная сыворотка обладала родовой иерсиниозной специфичностью (Таблица 4).

Нами также была определена оптимальная для иммунизации концентрация ПААГ. Для этого мы иммунизировали 3 группы кроликов, которым инъектировали по 2 мг ДА *Y. pseudotuberculosis* в смеси с различными концентрациями ПААГ (0,2%, 1%, 5%) в соотношении 1:1. Сыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных с использованием 0,2% раствора ПААГ, имели титр 1:51200, 1% раствором ПААГ – 1:409600, 5% раствором ПААГ – 1:102400. Таким образом, оптимальной для иммунизации является 1% концентрация раствора ПААГ.

Таблица 4 – Результаты определения специфичности сывороток крови кроликов, иммунизированных ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ

Бактериальные клетки в разведении 10 ⁹ клеток/мл	Количество антител полученных сывороток с клетками бактерий	
	титры	двоичные логарифмы титров для n = 5
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:1	1:25600	14,16±0,45
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:3	1:25600	14,48±0,73
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:4	1:12800	13,29±0,89
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:5	1:12800	13,34±0,79
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	1:25600	14,39±0,55
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	1:12800	13,01±0,92
<i>Escherichia coli</i>	1:400	8,87±0,45
<i>Salmonella typhimurium</i>	1:100	6,66±0,32
<i>Proteus vulgaris</i>	1:200	7,71±0,44
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1:200	7,19±0,14
<i>Brucella abortus</i>	1:200	7,77±0,59

Примечание – "n" – количество кроликов в группе.

Дополнительно к кроличьей гипериммунной сыворотке была получена аналогичная сыворотка крови морской свинки, т.к. в дальнейшем для создания иммуноферментной тест-системы необходимо будет наличие гипериммунных сывороток от двух видов животных.

Использование ЗНЧ в качестве адъюванта для получения иммунных сывороток к ДА иерсиний

На четвёртом этапе исследований нами была изучена возможность использования ЗНЧ в качестве адъюванта для получения гипериммунных сывороток к ДА энтеропатогенных иерсиний. В связи с тем, что значительных отличий по специфичности между ДА *Y. pseudotuberculosis* и ДА *Y. enterocolitica* в ранее проведённых исследованиях выявлено не было, нами в качестве иммуногена был использован ДА кишечной иерсиниозного микроба. Опыты проводились на мышах и кроликах (Таблицы 5 и 6).

Сначала были двукратно внутрибрюшинно иммунизированы белые мыши. Были иммунизированы 6 групп мышей. В данном опыте препаратом сравнения являлся ПАФ. Полученные сыворотки крови исследовали ИФА (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты 2-х кратной иммунизации мышей ДА *Y. enterocolitica* в комплексе с адьювантами: ЗНЧ, ПАФ и ЗНЧ + ПАФ

Группы мышей		Препараты для иммунизации		Двоичные логарифмы титров антител для n = 6
		Антиген	Адьювант	
1	опытные	ДА	ЗНЧ	10,36±0,49
2		ДА	ЗНЧ+ПАФ	13,14±0,75
3		ДА	ПАФ	11,62±0,62
4	контроль-ные	ДА	ФСБ	10,08±0,45
5		ФСБ	ЗНЧ	0
6		ФСБ	ФСБ	0

Примечание – "n" – количество мышей в группе.

Как видно из таблицы 5, ЗНЧ обладают адьювантными свойствами при использовании их в комплексе с ДА энтеропатогенных иерсиний. Однако действие их в 2 раза слабее, чем у ПАФ. Также можно отметить, что ЗНЧ способны усиливать адьювантные свойства ПАФ.

Дополнительно у иммунизированных мышей изучали активности перитонеальных макрофагов и уровень цитокинов в крови.

Анализ результатов изучения активности перитонеальных макрофагов показал, что ЗНЧ стимулируют клеточный иммунитет значительно больше, чем ПАФ. Дыхательная активность макрофагов повышалась при иммунизации ДА+ЗНЧ на 64%, ДА+ПАФ на 34%, ДА+ЗНЧ+ПАФ на 100% по сравнению с группой ФСБ.

Было установлено, что уровень интерферона- γ в группе ДА+ЗНЧ, был выше по сравнению с контролем в 1,8 раза, в группе ДА+ПАФ – в 2,3 раза, в группе ДА+ЗНЧ+ПАФ – в 2,7 раз. Уровень интерлейкина-1 β в группе ДА+ЗНЧ, был выше по сравнению с контролем в 2, раза, в группе ДА+ПАФ – в 1,8 раза, в группе ДА+ЗНЧ+ПАФ – в 4 раза. Уровень интерлейкина-6 в группе ДА+НЧЗ был выше по сравнению с контролем в 2 раза, в группе ДА+ПАФ – в 2,7 раза и в группе ДА+ЗНЧ+ПАФ – в 2,9 раза. Таким образом, проведённые исследования указали на способность ЗНЧ к двукратному подъёму уровня цитокинов.

Результаты указывают на перспективность применения ЗНЧ отдельно и в смеси с ПАФ для двукратной иммунизации животных ДА *Y. pseudotuberculosis*.

Также нами была выяснена возможность использования конъюгата ДА+ЗНЧ для получения гипериммунных сывороток крови кроликов. Для этого проводилась пятикратная подкожная иммунизация 3-х групп животных. В качестве антигена также использовали ДА *Y. enterocolitica* количестве 30 мкг на животное. Невысокая доза ДА была взята нами намеренно для снижения его влияния на антителогенез и получения более чёткой картины стимулирующего действия адьювантов. Полученные сыворотки изучали в ИФА (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты гипериммунизации кроликов ДА *Y. enterocolitica* в комплексе с адьювантами ЗНЧ и ПАФ

Иммуни-зации	Использованные для иммунизации адьюванты и антигены					
	ДА+ЗНЧ		ДА+ПАФ		ДА (контроль)	
	Титры антител полученных сывороток к ДА <i>Y. enterocolitica</i> / двоичные логарифмы титров антител для n = 5					
	титр	логарифм	титр	логарифм	титр	логарифм
До иммунизаций	–	–	1:50	5,62±0,15	–	–
1	1:1600	10,82±0,53	1:1600	10,98±0,30	1:400	8,60±0,57
2	1:6400	12,73±0,71	1:6400	12,72±0,80	1:800	9,76±0,61
3	1:6400	12,15±0,39	1:12800	13,05±0,46	1:800	9,77±0,53
4	1:6400	12,87±0,82	1:25600	14,83±1,04	1:1600	10,47±0,48
5	1:6400	12,57±0,82	1:51200	15,95±0,84	1:1600	10,39±0,47

Примечание – "–" – отрицательный результат; "n" – количество кроликов в группе.

В опыте с пяти кратной иммунизацией кроликов ЗНЧ не показали прироста высоких титров антител с 3 по 5 иммунизацию, поэтому в дальнейшем нам пришлось отказаться от применения ЗНЧ в качестве адьюванта (Таблица 6).

Создание иммуноферментной тест-системы

На пятом этапе была сконструированна иерсиниозная иммуноферментная тест-система на основе сывороток крови, полученных гипериммунизацией лабораторных животных ДА *Y. pseudotuberculosis* в комплексе с ПААГ. Последовательность внесения компонентов тест-системы представлена на рисунке 2.

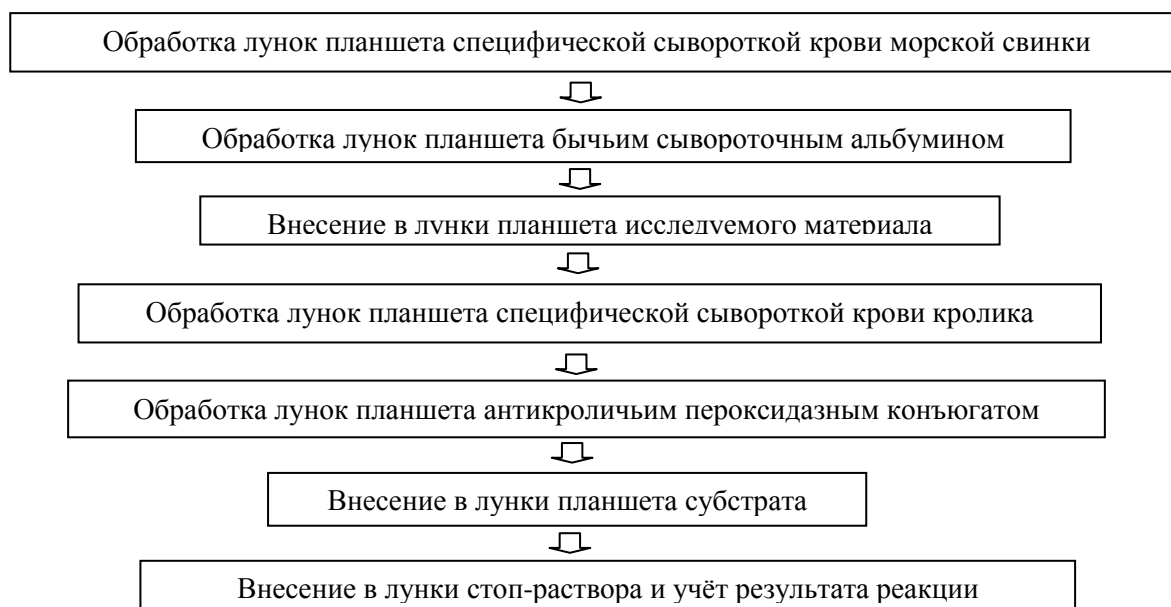


Рисунок 2 – Схема проведения непрямого варианта ИФА с экспериментальной иммуноферментной тест-системой

Лабораторные испытания созданной тест-системы проводили сначала с микробными взвесями (Таблица 7), а затем со средами накопления (Таблица 8).

Таблица 7 – Результаты определения чувствительности и специфичности иммуноферментной тест-системы с цельными клетками иерсиний

Бактериальные клетки		Сыворотки полученные		
		после иммунизации кроликов ДА У.р.	из коммерческих наборов для РНГА	
Штаммы	Серо-варианты		псевдо-туберкулёзного	кишечноиерсиниозного О:3
		Музейные штаммы иерсиний		
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	О:1	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	О:3	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV	О:4	10 ⁷	10 ¹⁰	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> V	О:5	10 ⁸	10 ¹⁰	–
<i>Y. enterocolitica</i> 66-82	О:3	10 ⁷	–	10 ⁹
<i>Y. enterocolitica</i> 383	О:9	10 ⁸	–	–
Штаммы иерсиний, выделенные от животных				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 40	О:3	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 67	О:3	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. enterocolitica</i> 12	О:3	10 ⁷	–	10 ⁹
<i>Y. enterocolitica</i> 58	О:3	10 ⁷	–	10 ⁹
Штаммы бактерий из других родов кишечной группы				
<i>Escherichia coli</i> 4295		–	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i> 1626		–	–	–
<i>Proteus vulgaris</i> 19		–	–	–
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC-13048		–	–	–

Испытание тест-системы с микробными взвесями показало иерсиниозную родовую специфичность тест-системы и чувствительность на уровне 10⁷-10⁸ микробных клеток на мл взвеси (Таблица 7).

В таблице 8 приведены результаты индикации возбудителей псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза средах накопления (1%-й ЗПВ и ФСБ) при помощи созданной тест-системы. В среды предварительно вносили фекалии свиней с различным содержанием *Y. pseudotuberculosis* или *Y. enterocolitica*. "Холодовое обогащение" обсеменённых иерсиниями сред накопления проводили в течение 3 и 6 суток. Гипериммунную сыворотку в тест-системе использовали в разведениях 1:200 и

1:1600, чтобы установить её рабочую концентрацию. Исследования проводили с неразведёнными средами накопления (цел.) и с их двукратными разведениями, что позволило оценить степень накопления иерсиний и проследить зависимость изменения оптической плотности от разведения содержимого лунки. Положительными считали результаты ИФА, превышающие по оптической плотности отрицательные контроли в 2 и более раз.

Таблица 8 – Чувствительность экспериментальной иммуноферментной тест-системы со средами накопления на 3-и и 6-е сутки "холодового обогащения" их *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*

Количество бактерий, внесённых в среды накопления		Среды накопления								
		1% ЗПВ				ФСБ				
		время обогащения, сутки								
		3		6		3		6		
		разведения сывороток к ДА, использованных для индикации иерсиний в средах								
		1:200	1:1600	1:200	1:1600	1:200	1:1600	1:200	1:1600	
		разведения среды, показавшие положительный результат с сывороткой к ДА								
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (Y. p.)	5×10 ⁵	1:8	1:2	1:32	1:8	1:4	цел.	1:16	1:4	
	5×10 ³	1:4	цел.	1:16	1:4	1:4	цел.	1:16	1:4	
	50	1:2	–	1:8	1:2	1:2	–	1:8	цел.	
	5	–	–	1:2	–	–	–	1:2	–	
<i>Y. enterocolitica</i> (Y. e.)	5×10 ⁵	1:8	1:2	1:32	1:8	1:4	цел.	1:16	1:4	
	5×10 ³	1:4	цел.	1:16	1:4	1:2	–	1:8	1:2	
	50	1:2	–	1:8	1:2	цел.	–	1:4	–	
	5	–	–	1:2	–	–	–	цел.	–	
Контроли	без фекалий	с Y. p.	1:16	1:4	1:64	1:16	1:4	цел.	1:16	1:4
		с Y. e.	1:16	1:4	1:64	1:16	1:4	цел.	1:16	1:4
	с фекалиями	без иерсиний	–	–	–	–	–	–	–	–

Исследование сред накопления при помощи тест-системы позволило смоделировать комплексное применение бактериологического и серологического методов диагностики иерсиниозов. Было установлено, что количество иерсиний, вносимых с фекалиями в среду накопления, для уверенной индикации их иммуноферментной тест-системой на третьи сутки "холодового обогащения" может составлять 50 клеток на мл среды, а на шестые сутки – 5 клеток на мл (Таблица 8).

Поиск животноводческого хозяйства Саратовской области с одновременной циркуляцией среди животных *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*

На шестом этапе исследований нами был проведён поиск животноводческого хозяйства Саратовской области с одновременной циркуляцией среди животных *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Данное хозяйство необходимо для испытания созданной тест-системы на сельскохозяйственных животных. Исследованию подверглись фекалии трёхсот шестидесяти поросят и четырёмсот телят двух-шести месячного возраста из 11 животноводческих хозяйств, расположенных в 7 районах Саратовской области (Таблица 9).

Таблица 9 – Циркуляция *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* у сельскохозяйственных животных в некоторых районах Саратовской области

Хозяйство и район области	Обследованные животные	Выделенные штаммы
СПХ "Озёрное", с. Озерное Аткарского района	80 свиней	<i>Y. enterocolitica</i> – 5
	40 телят	<i>Y. enterocolitica</i> – 2 <i>Y. pseudotuberculosis</i> – 2
СПХ "СХА Дружба", с. Казанла Базарно-Карабулакского района	80 свиней	<i>Y. enterocolitica</i> – 4
	40 телят	<i>Y. pseudotuberculosis</i> – 3
ООО "Феникс", с. Старые Бурасы Базарно-Карабулакского района	80 свиней	–
СХПК "Крутоярское", с. Крутояр Екатериновского района	40 КРС	<i>Y. pseudotuberculosis</i> – 4
ООО "Андреевка", с. Андреевка Екатериновского района	40 КРС	–
КФХ "Гадисов А.Г.", с. Лох Новобурасского района	40 телят	–
СПК "Надежда", с. Ионычёвка Петровского района	40 телят	–
СПК "Нива", с. Кожевино Петровского района	40 телят	–
ООО "СХП Дубковское", п. Дубки Саратовского района	40 телят	–
ООО "Ягоднополянское", с. Ягодная Поляна Татищевского района	80 свиней	–
	40 телят	–
КФХ "Аванесян А.А.", п. Светлый Татищевского района	40 свиней	–
	40 телят	–
Итого:	360 свиней 400 телят	<i>Y. pseudotuberculosis</i> – 9 <i>Y. enterocolitica</i> – 11

В трёх животноводческих хозяйствах было выделено 9 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 11 штаммов *Y. enterocolitica*. Все выделенные штаммы иерсиний проявили вирулентность и, кроме 2-х несеротипированных штаммов псевдотуберкулёзного микроба, были отнесены к O:3 сероварианту. Совместная циркуляция двух видов иерсиний обнаружена в СПХ "Озёрное" Аткарского района (Таблица 9). В данном хозяйстве рекомендовано тестировать экспериментальную диагностическую систему.

Испытание созданной тест-системы на сельскохозяйственных животных

На седьмом этапе было проведено испытание иммуноферментной тест-системы на молодняке сельскохозяйственных животных: свиньях и телятах (Таблица 10 и 11).

Было исследовано 45 проб фекалий от свиней (Таблица 10). Смывы фекалий из анальных отверстий животных помещали в ФСБ и инкубировали в условиях холодильника 3-6 дней для накопления иерсиний. Перед высевом на чашки со средой Эндо проводили исследование фекалий в среде накопления при помощи экспериментальной иммуноферментной тест-системы. ИФА позволял определять наличие иерсиний в среде даже в случае невозможности обора подозрительных колоний со среды Эндо по причине обилия посторонней микрофлоры, наличия на поверхности среды роста протей или плесени. Также положительный результат ИФА в пробе приводил к более тщательному её бактериологическому исследованию при повторном высеве.

Таблица 10 – Индикация энтеропатогенных иерсиний в фекалиях поросят при помощи экспериментальной тест-системы и бактериологического исследования

№№ проб	Время обогащения, сутки							ИФА, единицы оптической плотности
	3			ИФА, единицы оптической плотности	6			
	Бактериологическое исследование		Выделенные штаммы иерсиний		Бактериологическое исследование		ИФА, единицы оптической плотности	
	Кол-во отобранных колоний	У. р.			У. е.	Кол-во отобранных колоний		
6	2	–	–	0,221	4	+	–	0,352
20	2	–	+	0,199	1	–	+	0,264
26	2	–	–	0,217	4	–	+	0,273
38	1	–	+	0,230	1	–	+	0,317
1-5, 7-19, 21-25, 27-37, 39-45	72	–	–	0,081- 0,127	49	–	–	0,089- 0,139

На третий день "холодового обогащения" свиных фекалий бактериологический метод позволил выделить 2 штамма энтеропатогенных иерсиний и тест-система

дополнительно показала ещё две положительные пробы, с которых на шестой день также удалось выделить иерсинии, т.е. эффективность созданной тест-системы составила 50% по сравнению с бактериологическим методом (Таблица 10).

Результаты исследования телят представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Индикация энтеропатогенных иерсиний в фекалиях телят при помощи экспериментальной тест-системы и бактериологического исследования

№№ проб	Время обогащения, сутки							
	3				6			
	Бактериологическое исследование		ИФА, единицы оптической плотности	Бактериологическое исследование		ИФА, единицы оптической плотности		
	Кол-во отобранных колоний	Выделенные штаммы иерсиний		Кол-во отобранных колоний	Выделенные штаммы иерсиний			
У. р.		У. е.	У. р.		У. е.			
5	2	–	+	0,221	1	–	+	0,297
14	1	–	+	0,218	1	–	+	0,271
21	1	–	–	0,247	3	+	–	0,363
30	2	–	–	0,258	4	+	–	0,388
37	2	+	–	0,264	2	+	–	0,391
44	0	–	–	0,178	0	–	–	0,233
1-4, 6-13, 15-20, 22-29, 31-36, 38-43, 45-54	72	–	–	0,082- 0,115	46	–	–	0,085- 0,121

При исследовании 54 телят бактериологическим методом на 3 день накопления бактериологический анализ выявил три положительных пробы, а тест-система – шесть. На шестой день пять из шести проб были подтверждены выделением энтеропатогенных иерсиний. Таким образом, эффективность тест-системы оказалась выше бактериологического метода на 50% (Таблица 11).

Заключение

В результате проведённых исследований была создана родоспецифическая иммуноферментная тест-система для одновременной индикации возбудителей псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза у сельскохозяйственных животных, которая позволила повысить эффективность бактериологического метода. В данной тест-системе нами использованы гипериммунные сыворотки крови, полученные от лабораторных животных, иммунизированных ДА *Y. pseudotuberculosis* в комплексе с ПААГ. Дополнительно нами изучена возможность применения ЗНЧ для получения гипериммунных сывороток к ДА иерсиний.

Выводы

1. Получен диметилсульфоксид-антиген *Y. pseudotuberculosis*, который обладает большей антигенной активностью, чем диметилсульфоксид-антиген *Y. enterocolitica*.

2. Экспериментальная гипериммунная сыворотка к диметилсульфоксид-антигену *Y. pseudotuberculosis*, имеет родовую специфичность и проявляет более высокую специфическую активность, чем аналогичная сыворотка, полученная к диметилсульфоксид-антигену *Y. enterocolitica*. Титры антител в ИФА с клетками иерсиний для сыворотки к диметилсульфоксид-антигену *Y. pseudotuberculosis* составляют 1:6400-1:51200, а сыворотки к диметилсульфоксид-антигену *Y. enterocolitica* – 1:6400-1:25600.

3. Использование полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода в комбинации с диметилсульфоксид-антигеном *Y. pseudotuberculosis* позволяет получать экспериментальную гипериммунную сыворотку крови с высоким титром специфических антител в ИФА – 1:409600.

4. Золотые наночастицы стимулируют клеточный иммунитет, увеличивают образование специфических антител, способствуют синтезу лимфокинов, что позволяет использовать их в качестве адьюванта при двукратных иммунизациях животных, однако золотые наночастицы не обеспечивают достаточной стимуляции синтеза антител к диметилсульфоксид-антигену энтеропатогенных иерсиний при многократной иммунизации животных, что не даёт возможности использовать их для гипериммунизаций в комплексе с данным антигеном.

5. Иммуноферментная тест-система, созданная на основе экспериментальной гипериммунной сыворотки, выявляла бактерии *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в концентрации 10^7 - 10^8 клеток/мл. Количество иерсиний, вносимых с фекалиями в среду накопления, для уверенной индикации их иммуноферментной тест-системой на 3 сутки "холодового обогащения" составляло 50 клеток/мл среды, а на 6 сутки – 5 клеток/мл.

6. Экспериментальная иммуноферментная тест-система позволяет выявлять *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* у свиней и телят на 3-й и 6-й дни "холодового обогащения" в ФСБ с фекалиями исследуемых животных. Эффективность применения тест-системы превысила эффективность бактериологического метода на 50%.

Практические предложения

1. Предлагается использовать ПААГ в комбинации с ДА для получения диагностических гипериммунных сывороток.

2. Созданную иммуноферментную тест-систему предлагается применять для исследования сред накопления, при бактериологическом анализе фекалий сельскохозяйственных животных на присутствие энтеропатогенных иерсиний.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Планируется использовать ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ для создания других диагностических препаратов. Созданную иммуноферментную тест-систему планируется применять в комплексе с другими диагностическими препаратами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях из международной базы данных

1. **Manieson, V. E.** Comparative evaluation of *Yersinia* dimethyl-sulfoxide antigens and antibodies obtained from it / V. E. Manieson, S. V. Ivashchenko // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2020. – Vol. 421. – Article № 052028 (Scopus).
2. **Manieson, V. E.** The use of polyazolidine-ammonium and dimethyl-sulfoxide antigen *Yersinia pseudotuberculosis* to obtain hyperimmune serum / V. E. Manieson, S. V. Ivaschenko // E3S Web of Conf. – 2020. – Vol. 175. – Article № 03011 (Scopus).
3. Иммуностимулирующее действие наночастиц золота, конъюгированных с антигеном *Yersinia enterocolitica* / С. А. Староверов, А. С. Фомин, К. П. Габалов, С. В. Иващенко, В. Э. Маниесон, Л. А. Дыкман // Инфекция и иммунитет – 2021. – № 2 (1). – С. 377-382 (Scopus).

Публикации в сборниках и материалах конференций

4. Сравнительная оценка антигенных свойств диметилсульфоксид-фракции псевдотуберкулёзного и кишечной иерсиниозного микробов / С. В. Иващенко, **В. Э. Маниесон**, Я. Б. Древки, А. А. Щербаков // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Материалы междунар. науч.-практич. конф. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2017. – С. 46-51.
5. Сравнительная оценка антигенных фракций *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* / С. В. Иващенко, **В. Э. Маниесон**, Я. Б. Древки, А. А. Щербаков // Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии: Материалы междунар. науч.-практич. конф.; ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. – Саратов: ИЦ "Наука", 2017 – С. 148-152.
6. **Маниесон, В. Э.** Изучение новых антигенов иерсиний / В. Э. Маниесон // Современные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса России: Сборник статей междунар. конф. – Саратов: Изд-во "Амирит", 2017. – С. 109-110.
7. Возможность использования конъюгата золотых наночастиц для получения гипериммунной кишечной иерсиниозной сыворотки / С. В. Иващенко, Н. Р. Хисамутдинова, **В. Э. Маниесон**, Ч. К. Гонури, В. С. Кузнецова, Л. А. Дыкман // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Материалы междунар. науч.-практич. конф. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2018. – С. 138-142.
8. **Маниесон, В. Э.** Использование конъюгата золотых наночастиц с диметилсульфоксид-антигеном при получении гипериммунной иерсиниозной сыворотки / В. Э. Маниесон, С. В. Иващенко, Л. А. Дыкман // Современные проблемы

и перспективы развития агропромышленного комплекса: Сборник статей; ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. – Саратов: 2018. – С. 154-157.

9. Иващенко, С. В. Получение антител к диметилсульфоксид-антигену *Yersinia pseudotuberculosis* / С. В. Иващенко, **В. Э. Маниесон** // Новости науки в АПК: научно-практический журнал: в 2 т. – Ставрополь: АГРУС Ставропольского ГАУ, 2018. – № 2(11). – Т. 1. – С. 340-343.

10. **Маниесон, В. Э.** Определение иммунизирующей дозы ДМСО-антигена *Yersinia pseudotuberculosis* для получения гипериммунных сывороток крови кроликов / В. Э. Маниесон, С. В. Иващенко, И. О. Капитонова // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Материалы междунар. науч.-практич. конф. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2019. – С. 73-77.

11. Получение конъюгата наночастиц золота с антигеном *Yersinia enterocolitica* и изучение его иммуногенного и протективного эффекта / **В. Э. Маниесон**, С. В. Иващенко, А. С. Фомин, К. П. Габалов, С. А. Староверов, Л. А. Дыкман // Зыкинские чтения: Материалы национальной науч.-практич. конф. посв. памяти д.м.н., проф. Л. Ф. Зыкина. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2020. – С. 74-80.

12. Иващенко, С. В. Подбор доз антигена и адьюванта для получения иерсиниозной гипериммунной сыворотки / С. В. Иващенко, **В. Э. Маниесон** // Зыкинские чтения: материалы национальной науч.-практич. конф. посв. памяти д.м.н., проф. Л. Ф. Зыкина; Саратовский ГАУ. – Саратов: ООО "ЦеСАин", 2021. – С. 122-127.

Список сокращений, использованных в автореферате

ДА – диметилсульфоксид-антиген

ДМСО – диметилсульфоксид

ЗПВ – забуференная пептонная вода

ЗНЧ – золотые наночастицы

ИФА – иммуноферментный анализ

кДа – килодальтон

КРС – крупный рогатый скот

ЛПС – липополисахарид

м.к./мл - микробных клеток в миллилитре

МПА – мясопептонный агар

ОРА – ориентировочная реакция агглютинации

ПААГ – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода

ПАФ – полный адьювант Фрейнда

РА – реакция агглютинации

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

ФР – физиологический раствор

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор