

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования "Саратовский государственный университет генетики,  
биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова"

На правах рукописи

КУЗНЕЦОВА ВЕРА СЕРГЕЕВНА

**Создание экспериментальной иммуноферментной тест-системы  
и её дот-варианта для индикации *Yersinia pseudotuberculosis*  
у сельскохозяйственных животных**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук,  
доцент Иващенко С.В.

Саратов – 2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

	Стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	4
1.1. Циркуляция возбудителя псевдотуберкулёза среди людей и животных	11
1.2. Лабораторная диагностика псевдотуберкулёза	15
1.3. Антигенные свойства возбудителя псевдотуберкулёза	26
1.4. Адьюванты для иммунизации животных	33
<b>2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	
2.1. Материалы и методы исследований	36
2.2. Результаты исследований и их обсуждение	54
2.2.1. Изучение белков, входящих в состав дезинтегрированных мембран <i>Y. pseudotuberculosis</i>	54
2.2.2. Специфическая активность дезинтегрированных мембран <i>Y. pseudotuberculosis</i> и гипериммунных сывороток крови, полученных в результате иммунизации кроликов данным антигеном	57
2.2.3. Получение липополисахарида <i>Y. pseudotuberculosis</i> и определение его иммунизирующей дозы на белых мышах	61
2.2.4. Использование полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в качестве адьюванта для получения кроличьих гипериммунных сывороток к дезинтегрированным мембранам <i>Y. pseudotuberculosis</i>	64
2.2.5. Использование полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, и дезинтегрированных мембран <i>Y. pseudotuberculosis</i> для получения гипериммунных	

сывороток морских свинок	69
2.2.6. Использование полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в качестве адъюванта для получения гипериммунных сывороток к липополисахариду <i>Y. pseudotuberculosis</i>	70
2.2.7. Возможность использования антител, полученных к антигенам клеточной стенки <i>Y. pseudotuberculosis</i> , в дот-иммуноанализе	75
2.2.8. Создание иммуноферментной тест-системы на основе антител, полученных к дезинтегрированным мембранам <i>Y. pseudotuberculosis</i>	78
2.2.9. Создание дот-иммунотест-системы на основе антител, полученных к дезинтегрированным мембранам <i>Y. pseudotuberculosis</i> , и золотых наночастиц	83
2.2.10. Индикация <i>Y. pseudotuberculosis</i> у сельскохозяйственных животных	88
2.2.11. Испытание созданных тест-систем для индикации <i>Y. pseudotuberculosis</i> у свиней	91
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	96
<b>ВЫВОДЫ</b>	99
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ</b>	100
<b>ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ</b>	100
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b>	101
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	103
<b>ПРИМЕЧАНИЯ</b>	131

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** В настоящее время появляется значительное количество сообщений о выделениях *Yersinia pseudotuberculosis* от сельскохозяйственных животных [180, 216, 210, 214, 182, 179, 117]. Сельскохозяйственные животные могут являться источниками загрязнения продуктов питания иерсиниями. У людей вспышки псевдотуберкулёзной инфекции происходят достаточно часто и носят массовый характер [221, 184]. Эпидемиологическая ситуация обусловлена способностью бактерии размножаться на продуктах питания в психрофильных условиях и циркуляцией возбудителя среди грызунов.

Основным методом лабораторной диагностики псевдотуберкулёза в ветеринарных лабораториях является бактериологический анализ. Недостаточную эффективность и высокую трудоёмкость бактериологического метода при диагностике псевдотуберкулёза можно компенсировать применением его в комплексе с серологическими исследованиями [86].

Ассортимент существующих на сегодняшний день псевдотуберкулёзных диагностических препаратов недостаточен и ориентирован на потребности медицины. Коммерческие иммуноферментные диагностические препараты создаются на основе 1 сероварианта микроба [59], тогда как у животных наиболее часто встречается 3 сероварианта *Y. pseudotuberculosis* [180, 216, 210, 214, 179]. Для создания диагностических тест-систем, позволяющих выявлять широкий спектр серовариантов псевдотуберкулёзного микроба, можно использовать его дезинтегрированные мембраны (ДМ). Данный антиген, и полученные к нему антитела, хорошо зарекомендовали себя для диагностики псевдотуберкулёза у животных с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и метода флуоресцирующих антител (МФА) [28]. Однако для таких современных методов диагностики, как иммуноферментный анализ (ИФА) и дот-иммуноанализ (ДИА) с золотыми наночастицами (ЗНЧ), антитела к ДМ *Y. pseudotuberculosis* не были использованы.

Для создания диагностических препаратов немаловажным этапом является получения гипериммунных сывороток крови. В настоящее время для производства диагностических антител широко используется полный адьювант Фрейнда (ПАФ) [200], но поиски новых результативных и безопасных препаратов активно продолжаются до настоящего времени [72]. Область поиска должна включать также вакцинные адьюванты, ранее не использовавшиеся при получении гипериммунных диагностических сывороток. Одним из таких адьювантов, предложенных для создания вакцин, является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ) [69].

### **Степень разработанности темы исследования**

Оценка диагностического значения белков внешней мембраны псевдотуберкулёзного микроба и антител, полученных к ним, проведена в ряде научных работ [48, 4, 75]. Однако ДМ *Y. pseudotuberculosis*, использованные в нашей работе, являются комплексным препаратом, содержащим белки и ЛПС. Аналогичный антиген был изучен и использован для гипериммунизации кроликов в работе С.В. Иващенко и А.А. Щербакова [27]. На основе ДМ *Y. pseudotuberculosis* и антител к ним авторами был создан эритроцитарный антигенный псевдотуберкулёзный диагностикум, а также флуоресцирующие псевдотуберкулёзные иммуноглобулины. Данные препараты были успешно испытаны для индикации иерсиний и антител к ним у сельскохозяйственных животных. Однако в ИФА и ДИА с ЗНЧ ДМ *Y. pseudotuberculosis* и антитела, полученные к ним, использованы не были.

ПААГ в качестве адьюванта впервые был предложен В.М. Скорляковым. с соавт. для вакцинации животных [69]. В данном случае ПААГ применялся в комплексе с микрочастицами карбоната кальция с размером 1-5 мкм. Для гипериммунизации животных с целью создания антительных диагностических препаратов ПААГ был использован впервые в наших опытах [20]. Мы применили ПААГ в комплексе с ДМ *Y. pseudotuberculosis*. На сегодняшний день существует ряд более поздних работ, посвященных гипериммунизации

животных с использованием ПААГ в комплексе с ДМ *Xanthomonas campestris* [75], диметилсульфоксид-антигеном *Y. pseudotuberculosis* [170].

Ветеринарных коммерческих псевдотуберкулёзных препаратов для ИФА не выпускается. Однако для диагностики псевдотуберкулёза у человека имеется несколько отечественных и импортных иммуноферментных тест-систем. В основном они предназначены для индикации специфических антител. Единственная российская коммерческая иммуноферментная тест-система, позволяющая выявлять бактерию у людей, ориентирована на определение 1 сероварианта *Y. pseudotuberculosis* [59]. ДИА с ЗНЧ для диагностики псевдотуберкулёза распространения не получил.

**Цель** – создание псевдотуберкулёзных диагностических тест-систем на основе ИФА и ДИА с ЗНЧ для индикации возбудителя псевдотуберкулёза у сельскохозяйственных животных.

Основные задачи проведённых исследований:

1. Изучить антигенные свойства ДМ *Y. pseudotuberculosis*.
2. Получить гипериммунную сыворотку крови к ДМ *Y. pseudotuberculosis* и оценить её специфическую активность.
3. Провести оценку ПААГ в качестве адъюванта при гипериммунизации лабораторных животных ДМ и липополисахаридом (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis*.
4. Применить антитела, полученные при использовании ДМ *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ, для создания иммуноферментной тест-системы и её дот-варианта с ЗНЧ.
5. Определить эффективность созданных тест-систем путём индикации псевдотуберкулёзного микроба у телят после "холодового обогащения" их фекалий.

**Научная новизна работы.** Впервые ПААГ был использован в качестве адъюванта для многократной иммунизации лабораторных животных ДМ и ЛПС *Y. pseudotuberculosis* с целью получения диагностических антител.

На основе полученных антител впервые создана и успешно испытана на телятах в СПХ "Заря", с. Большая Сакма, Краснопартизанского района

псевдотуберкулёзная диагностическая иммуноферментная тест-система и её дот-вариант с ЗНЧ. Данные препараты позволяют проводить индикацию 1, 3, 4, 5 серовариантов псевдотуберкулёзного микроба.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследований дополняют теоретическую базу по изучению взаимодействия белковых и липополисахаридных микробных антигенов с полиэлектролитными адьювантами. Показана возможность получения диагностических псевдотуберкулёзных сывороток крови животных при комплексном использовании ДМ *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ. Создана антительная иммуноферментная псевдотуберкулёзная тест-система и её дот-вариант с ЗНЧ, применение которых позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики инфекции у животных. Для применения созданных препаратов разработаны две инструкции: "Инструкция по применению дот-иммунотест-системы для ускоренного выявления возбудителя псевдотуберкулёза животных в средах накопления" (Иващенко С.В., Кузнецова В.С., 2023); "Инструкция по применению иммуноферментной тест-системы для ускоренного выявления возбудителя псевдотуберкулёза животных в средах накопления (фосфатно-солевом буфере)" (Иващенко С.В., Кузнецова В.С., 2023). Результаты диссертационной работы внедрены в СПХ "Заря", с. Большая Сакма, Краснопартизанского района Саратовской области, что отражено в соответствующем акте ветеринарной государственной службы (акт от 22.04.2020 г). Материалы исследований используются при проведении учебных занятий со студентами специальности "Ветеринария" и направления подготовки "Биотехнология" в ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

**Методология и методы исследования.** Методология исследования определялась в соответствии с изученными трудами отечественных и зарубежных ученых. Были изучены и использованы в работе труды по лабораторной диагностике псевдотуберкулёза, созданию антительных диагностических препаратов, иммунному ответу животных, распространению псевдотуберкулёзной инфекции у животных и людей. Использование

теоретико-методологического анализа научных литературных источников и применение эмпирических методов исследования обеспечило достоверность полученных в работе результатов.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Комплексное применение ПААГ и ДМ *Y. pseudotuberculosis* позволяет получать гипериммунные псевдотуберкулёзные сыворотки крови лабораторных животных с высоким титром специфических антител.

2. Использование ПААГ в качестве адъюванта стимулирует антителогенез к ЛПС псевдотуберкулёзного микроба.

3. Гипериммунные сыворотки, полученные после иммунизации лабораторных животных ДМ *Y. pseudotuberculosis* в сочетании с ПААГ, позволяют выявлять псевдотуберкулёзный микроб при помощи ИФА и ДИА с ЗНЧ. Чувствительность иммуноферментной тест-системы составила  $10^6$ - $10^7$  м.к./мл, а дот-иммунной –  $10^7$ - $10^8$  м.к./мл.

4. На основе гипериммунных сывороток, полученных к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, создана иммуноферментная тест-система, которая может выявлять псевдотуберкулёзный микроб у телят после "холодового обогащения" их фекалий.

5. Созданный на основе гипериммунных сывороток к ДМ *Y. pseudotuberculosis* и ЗНЧ дот-вариант тест-системы способен выявлять псевдотуберкулёзный микроб у телят после "холодового обогащения" их фекалий.

**Работа выполнена** в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова" (ФГБОУ ВО Вавиловский университет).

#### **Степень достоверности и апробация работы**

Степень достоверности работы подтверждается анализом значительного объёма литературного и фактического материала, а также использованием современного сертифицированного оборудования, лабораторных и



сельскохозяйственных животных. Полученные результаты подвергнуты статистической обработке.

Основные положения диссертационной работы представлены на: Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий" (Саратов, 2018), Конференции по результатам реализации комплексного плана научных исследований "Диагностика и мониторинг особо опасных инфекций животных" (Саратов, 2018), II International Conference "AGRITECH-II-2019: Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies" (Красноярск, 2019), XIII Международной научно-практической конференции "Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса", посвящённой 90-летию ДГТУ (РИСХМ) (Ростов-на-Дону, 2020), Конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2020 год (Саратов, 2021), AgroBioTech 2021: Международной научно-исследовательской конференции "Приоритетные направления развития сельского хозяйства, прикладной биотехнологии и промышленного производства" (Барнаул, 2021), International Scientific and Practical Conference "VAVILOV READINGS-2021" (VVRD 2021) dedicated to the 101st anniversary of the discovery of the law of homological series and the 134th anniversary of the birth of N.I. Vavilov (Саратов, 2021), Национальной научно-практической конференции "Зыкинские чтения" посвящённой памяти д.м.н., проф. Зыкина Леонида Фёдоровича (Саратов, 2022), Конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2022 год, посвящённой 110-летию Вавиловского университета (Саратов, 2023), Национальной научно-практической конференции "Зыкинские чтения" посвящённой памяти д.м.н., проф. Зыкина Леонида Фёдоровича (Саратов, 2023).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и 5 статей в изданиях из международной базы данных (Scopus, Web of Science, Agris).

**Личный вклад соискателя** заключается в формулировании целей и задач проводимых исследований, анализе литературных данных, освоении современных методик исследования, подготовке и проведении экспериментальной части работы, анализе и интерпретации полученных результатов, публикации статей по теме диссертации.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 145 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, приложений. Работа иллюстрирована 6 рисунками и 18 таблицами. Список литературы включает 225 источников, из которых 114 иностранных.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Циркуляция возбудителя псевдотуберкулёза среди людей и животных

Энтеропатогенные иерсинии – *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* по распространённости среди людей в Европейском союзе занимают третье место после возбудителей сальмонеллеза и кампилобактериоза. Несмотря на то, что на долю псевдотуберкулёза в Европе приходится всего лишь 1% от всех случаев иерсиниоза, его значение в странах северо-восточной части Европы велико. В Финляндии и Литве наблюдаются значительные вспышки инфекции. Также высокой сохраняется заболеваемость псевдотуберкулёзом в Японии. Единичные случаи псевдотуберкулёза среди населения отмечаются в других странах мира: Канаде, США, Бразилии, Колумбии, Китае, Нигерии и др. [30, 78, 79, 113, 115, 116, 129, 131, 138, 142, 156, 173, 174, 221, 223]. В России псевдотуберкулёз регистрируется во многих регионах в виде вспышек или спорадических случаев. Средняя заболеваемость по стране составляет 4,2 на 100 тысяч населения. Однако наибольшая заболеваемость отмечается в сибирском, дальневосточном и северо-западном федеральных округах. 67% случаев приходится на Сибирь, 26% на европейскую часть России и 7% на Дальний Восток. Серопозитивных людей в Якутской области выявлено 25%. Для псевдотуберкулёза характерны: лихорадка, ангина, высыпания на коже, боли в животе, артрит и в тяжёлых случаях летальный исход [29, 30, 31, 40, 42, 51, 54, 56, 58, 59, 78, 79, 80, 81, 85, 87, 106, 108, 109, 110, 184].

Основным резервуаром *Y. pseudotuberculosis* является внешняя среда. Возбудитель выделяют из почвы, воды, растений. Психрофильность микроба определяет его устойчивость во внешней среде. Микроб способен размножаться при температуре 4-10 °С и накапливаться в продуктах питания и кормах. При этом иерсинии синтезируют "холодовые" изоферменты – каталазы, уреазы, липазы, гиалуронидазы и нейраминидазы [30, 78, 79, 81].

Заражение человека псевдотуберкулёзом происходит преимущественно алиментарным путём через загрязнённые овощи и воду. Наибольшую опасность представляют термически необработанные овощи: морковь, белокочанная капуста, репчатый лук, свекла, яблоки, салат. Они могут являться причиной массового заболевания людей псевдотуберкулёзом после употребления овощного салата и винегрета. Во время зимнего хранения овощей количество псевдотуберкулёзного микроба на них значительно возрастает, что определяет зимне-весеннюю сезонность заболевания. Пик заболеваемости приходится на февраль-май [25, 29, 30, 31, 51, 56, 58, 78, 79, 81, 85, 108, 109, 110, 113, 115, 156, 184, 221, 223].

Большое значение в поддержании природных очагов псевдотуберкулёза играют грызуны, птицы и другие дикие животные, поэтому псевдотуберкулёз считают зоосапронозной инфекцией природно-очагового характера. Заражение диких животных осуществляется при помощи фекально-орального механизма передачи возбудителя. Природные очаги развиваются по схеме: животное → окружающая среда → животное. Человек в таких очагах обычно не инфицируется [25, 29, 30, 51, 58, 78, 79, 81, 87, 109, 110].

Опасным для человека является занос возбудителя псевдотуберкулёза из природного очага в популяцию синантропных грызунов населенных пунктов. На окраинах антропоургического очага и в парковой зоне инфекция распространяется дикими грызунами (различными полевками, водяной крысой, бурозубкой и др.), а в центре – синантропными грызунами (серой крысой, домовый мышью и др.). Грызуны инфицируют своими выделениями овощи, фрукты и другие продукты в складских помещениях. По различным данным заражённость диких грызунов *Y. pseudotuberculosis* может колебаться: от 16,8% (во Франции) до 60,5%. (в Японии). В крупных городах заражённость грызунов ниже: в Москве – 2,4%, в Санкт-Петербурге – 5,7% [25, 29, 30, 51, 58, 78, 79, 81, 87, 109, 110, 156].

Роль птиц в поддержании псевдотуберкулёзных очагов изучена слабо. Имеются данные, что заражённость дроздов в Швеции составляет 0,6%, а

лесных голубей во Франции – до 6,8%. Также известны случаи выделения микроба от диких и домашних животных: кабанов и летучих мышей в Швейцарии и Германии, обезьян в Японии, зайцев во Франции [29, 78, 79, 109, 156, 181, 199, 211, 212, 217, 222, 224].

Несмотря на преобладающее выделение *Y. pseudotuberculosis* из овощей и от грызунов, сельскохозяйственные животные также служат дополнительным резервуаром возбудителя для людей. Заражённость свиней в Великобритании составляет 18%, Нигерии – 2-9,2%, Ленинградской области РФ – 7%, в Латвии – 5%, в Бельгии – 0,3-2%, в Эстонии и Италии – 1%. Выделен микроб от свиней также в Литве, Финляндии, Саратовской области РФ. У животных преимущественно выделяется О:3 серовариант микроба и редко – О:1 и О:4 сероварианты [26, 28, 58, 109, 174, 179, 180, 182, 207, 210, 214, 216, 218]. Также известны случаи выделения возбудителя от крупного рогатого скота (КРС), буйволов, овец, домашних оленей, лошадей, кошек [26, 28, 109, 117, 148, 156, 174, 192, 214]. Массовые вспышки псевдотуберкулёза с летальным исходом могут возникать у сельскохозяйственной птицы (кур, индюков) [25, 109, 156].

Определение псевдотуберкулёзных антител проводилось у свиней, овец, КРС и лошадей. Количество серопозитивных животных обычно на порядок превышает число выделенных от них микробных штаммов, что свидетельствует о недостаточной эффективности бактериологического метода диагностики. Например, количество серопозитивных свиней в Испании составляет 25%, в Швейцарии – 30%, в России – 28,6%. Антитела к *Y. pseudotuberculosis* были также обнаружены у 6,7% овец, 6,9% коров, 1,6% лошадей в РФ. Общее количество серопозитивных сельскохозяйственных животных по РФ составило 14,2% [28, 85, 87, 117, 181, 183, 184].

Случаев непосредственного заражения людей псевдотуберкулёзом от больных животных не установлено. Подтверждением этого служит выделение от больных псевдотуберкулёзом людей в 70-90% случаев *Y. pseudotuberculosis* О:1 сероварианта, нехарактерного для сельскохозяйственных животных, но достаточно часто выделяемого из окружающей среды [56, 58, 81, 94, 95, 108,

109, 113, 115, 129, 156, 173, 184, 221, 223]. Однако от 10 до 30% случаев заболеваний человека приходится на O:3 серовариант микроба, что не позволяет полностью исключать роль животных как источника инфекции для человека [58, 81, 94, 95, 108, 109, 116, 156, 173]. Установлено, что больные животные являются причиной загрязнения псевдотуберкулёзным микробом мясного и молочного сырья [25, 174, 179, 207]. Антитела к псевдотуберкулёзному микробу выявляются у работников мясного производства в 5,2% случаев, у работников сельского хозяйства в 2,2% случаев и работников торговли и общественного питания в 3,1% случаев [184].

Установлено, что псевдотуберкулёзный микроб адсорбируется на поверхности эпителия кишечника. Затем он проникает в цитоплазму эпителиальных клеток и фагоцитов, где активно размножается. Также быстро *Y. pseudotuberculosis* проникают в кровяное русло, в ткани печени, селезенки, лёгких и лимфатических узлов. В опытах установлено, что время проникновения микроба в кровоток составляет 5-7 минут. При псевдотуберкулёзе помимо кишечника у животных могут поражаться лёгкие и наступать гибель. Также для псевдотуберкулёза животных характерно латентное течение [25, 78, 79, 94, 156, 199, 214].

От животных и окружающей среды могут выделяться также невирулентные штаммы *Y. pseudotuberculosis* [126, 157].

Диагностику псевдотуберкулёза необходимо проводить в комплексе с исследованиями на возбудителя кишечного иерсиниоза и других бактериальных кишечных патогенов. Необходимость этого подтверждается случаями одновременной циркуляции у животных стада нескольких видов патогенных бактерий [180, 181, 182, 217, 218].

На основании вышеизложенного можно констатировать, что псевдотуберкулёзный микроб поражает преимущественно человека. И при этом основным заражающим фактором являются растительные продукты питания и грызуны. Однако сельскохозяйственные животные являются дополнительным резервуаром микроба для человека. Микроб выделяется от многих видов

сельскохозяйственных животных и птиц. У животных наблюдается наряду с открыто протекающей инфекционной болезнью также носительство возбудителя, требующее обязательного использования лабораторной диагностики. При этом полной картины распространения псевдотуберкулёзной инфекции в России и за её рубежами нет. Данные обстоятельства требуют проведения массовых исследований сельскохозяйственных животных на псевдотуберкулёз с привлечением лабораторных методов диагностики.

## **1.2. Лабораторная диагностика псевдотуберкулёза**

### *Бактериологический метод диагностики псевдотуберкулёза*

Лабораторная диагностика псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза во многом сходна и осуществляется с использованием бактериологического, серологического и молекулярно-генетического методов.

Несмотря на то, что бактериологический метод является "золотым стандартом" при диагностике псевдотуберкулёза [94, 95], эффективность его не высока. Возбудитель выделяется у 26-70% инфицированных людей при вспышках и у 3-15% в случае спорадических заболеваний [30, 31, 78, 94, 95]. Количество клинических диагнозов, подтверждённых серологическими методами, составляет в зависимости от региона РФ 32-84% [31, 54], а полимеразной цепной реакцией (ПЦР) – 1-84,6% [31, 54].

Бактериологическая диагностика псевдотуберкулёза состоит из 4-х этапов:

- 1) взятие и транспортировка патологического материала;
- 2) обогащение патологического материала на жидких селективных питательных средах при пониженных температурах ("холодовое обогащение");
- 3) рассев обогащённого патологического материал на плотных селективных дифференциально-диагностических средах с предварительной "щелочной обработкой";

4) идентификацию выделенной "чистой культуры" иерсиний с помощью различных тестов [30, 54, 58, 59, 79, 78, 81, 104, 110, 149, 154].

Для транспортировки материала можно использовать среду Кэри-Блэра, фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), забуференный физиологический раствор с рН 7,6 (ЗФР) в соотношении 1:10 [25, 54, 59, 78, 79, 109].

Прямой высеv патологического материала на плотные селективные дифференциально-диагностические среды слабоэффективны. Его применяют только в случае исследования паренхиматозных органов и пищевых продуктов. Также прямой высеv можно проводить при групповых заболеваниях. Для прямого высева используют питательные среды со значительными селективными свойствами, например, среду с бромтимоловым синим (СБТС) [30, 54, 58, 79, 104, 110, 154].

Наиболее эффективным является исследование фекалий в первые две недели болезни. Количество выделяемых бактерий в данный период составляет  $10^6$ - $10^9$  м.к./г. Исследование фекалий требует их предварительного обогащения на бедных питательными веществами жидких средах. Данная процедура позволяет избавиться от большого количества посторонней микрофлоры, которая затрудняет выделение "чистой культуры" псевдотуберкулёзного микроба. Для накопления иерсиний можно использовать жидкую среду Серова, 1%-ю забуференную пептонную воду (1% ЗПВ), буферно-казеиново-дрожжевую среду (БКД), пептонно-калиевую среду (ПК), фосфатно-буферный солевой бульон с добавлением 1% маннита и 0,15% желчных солей (ФМЖ), фосфатно-буферный солевой бульон с маннитом и пептоном (ФМП), ФСБ, ЗФР [25, 29, 30, 54, 56, 58, 59, 78, 79, 81, 85, 104, 110, 149, 154, 156, 179, 184, 207, 216].

Процесс накопления энтеропатогенных иерсиний на бедных питательных средах многие авторы рекомендуют проводить при пониженных температурах. "Холодовое обогащение" осуществляется при 4-10 °С с посевами на плотные селективные дифференциально-диагностические питательные среды на 3, 5, 10, 15 и 21 сутки обогащения. Однако следует отметить, что данные условия не



припятствуют накоплению непатогенных видов иерсиний и психрофильных бактерий из других родов [25, 30, 54, 56, 58, 59, 78, 79, 81, 85, 104, 110, 149, 154, 156, 179, 184, 207, 216].

Для повышения эффективности этапа селективного обогащения в жидкие среды можно вносить высокоселективные добавки – иргазан с тикарцилином (среда ИТС). Данная среда позволяет сократить сроки выделения энтеропатогенных иерсиний до 2-4 дней без значительного понижения температуры культивирования [181, 207, 216].

Чтобы сократить количество посторонней психрофильной микрофлоры, накопившейся за период "холодового обогащения", жидкую среду подвергают "щелочной обработке". Проводится данная обработка непосредственно перед высевом на селективную дифференциально-диагностическую плотную среду при помощи 0,5-0,72% раствора КОН в течение 3-5 минут. "Щелочная обработка" способствует гибели бактерий из родов *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* [25, 30, 41, 54, 58, 59, 78, 79, 81, 85, 104, 109, 110, 149, 154, 184, 207, 216].

Обработанную щёлочью микробную взвесь для выделения из неё *Y. pseudotuberculosis* можно высевать на следующие плотные селективные дифференциально-диагностические среды: среду Эндо, среду Левина, среду Мак-Конки, среду Серова, СБТС, иерсиния-агар, цефсулодин-иргазанновобиоциновую среду (CIN агар). Последние три среды являются высокоселективными и хорошо ингибируют постороннюю микрофлору. Однако на CIN-агар вырастают не все штаммы *Y. pseudotuberculosis*. Эффективность СБТС при исследовании фекалий составляет 26% [25, 29, 30, 41, 54, 56, 58, 59, 79, 78, 81, 83, 85, 104, 109, 110, 149, 154, 156, 181, 184, 190, 207, 216, 224].

После культивирования на плотных питательных средах при температуре 24-30 °С в течение 2-4 суток проводится отбор колоний с характерными культуральными и биохимическими свойствами: некрупные, лактозонегативные, уреазоположительные, маннитоположительные колонии,

растущие в S- и SR-формах [25, 30, 54, 58, 59, 78, 79, 81, 104, 110, 154, 181, 207, 216].

Идентификация отобранных "чистых культур" может проводиться с применением микроскопических, биохимических, молекулярно-генетических, серологических и других методов лабораторной диагностики.

Традиционно идентификация псевдотуберкулёзного микроба начинается с микроскопии по методу Грама и теста на наличие фермента оксидазы. Также определяются сахаролитические свойства микроба (ферментация лактозы, маннита, сахарозы, рамнозы, раффинозы, мелибиозы), разложение мочевины и цитрата, наличие ацетоина, образование сероводорода, декарбоксилирование лизина и орнитина, дезаминирование фенилаланина, подвижность [25, 30, 54, 58, 59, 78, 79, 81, 104, 109, 110, 149, 154, 156].

Более быстрое и полное определение биохимических свойств бактерии можно провести с использованием биохимических микротест-систем и биохимических автоматизированных анализаторов отечественного и зарубежного производства. Наиболее востребованными являются микротест-системы: ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-24 производства фирмы ООО НПО "Диагностические системы" (г. Н. Новгород, Россия), ММТ Е24 производства фирмы ООО НПО "Иммунотэкс" (г. Ставрополь, Россия), API® 20E производства фирмы "bioMérieux S.A." (Марси-л'Этуаль, Франция), Vitek GNI производства фирмы "bioMérieux Inc." (Хейзелвуд, США), Micronaut E производства "Merlin Diagnostik GmbH" (Борнхайм-Херсель, Германия) и Mikro-LA-Test ENTEROtest 24 N производства фирмы "Erba Lachema" (Брно, Чехия). Эффективность импортных тест-систем по определению псевдотуберкулёзного микроба составляет 90% [30, 54, 59, 81, 88, 156, 158, 179, 181, 207, 216, 224].

Дополнительные тесты для идентификации *Y. pseudotuberculosis* можно проводить с помощью диагностических препаратов, выпускаемых ФКУН РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора, Россия: 1) фага диагностического псевдотуберкулёзного; 2) иммуноглобулинов диагностических

псевдотуберкулезных поливалентных адсорбированных лошадиных для реакции агглютинации на стекле; 3) иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих псевдотуберкулезных адсорбированных лошадиных [25, 59, 79, 81, 83, 84, 110]. Идентификация *Y. pseudotuberculosis* также может быть проведена методом ПЦР [25, 58, 59, 181].

Серотипирование псевдотуберкулёзного микроба можно проводить при помощи агглютинирующих псевдотуберкулёзных моновалентных кроличьих сывороток к О:1 и О:3 серовариантам микроба производства ФБУН НИИЭМ им. Пастера (Санкт-Петербург, Россия) или импортными производства Denka Seiken (Токио, Япония), Mast Group Ltd. (Бутл, Великобритания) [25, 30, 54, 58, 59, 78, 79, 81, 83, 104, 110, 149, 154, 179, 181, 207, 216, 224]. Данный этап диагностики можно заменить О-генотипированием, осуществляемым при помощи ПЦР [29, 56, 59, 107, 149, 154, 184, 209].

Все выделенные штаммы *Y. pseudotuberculosis* 1-5 серовариантов считаются патогенными [30, 79, 104, 149, 153, 156, 167]. Однако вирулентность их может различаться. В значительной мере вирулентность псевдотуберкулёзного микроба связана с наличием родоспецифической плазмиды вирулентности (pYV) 42-48 МДа, кодирующей значительную часть факторов вирулентности иерсиний [29, 54, 58, 59, 79, 87, 107, 152, 154, 156, 158, 179, 184, 190, 205, 207], а также с присутствием ряда хромосомных генов [29, 54, 56, 58, 59, 79, 87, 107, 153, 156, 179, 181, 184, 190, 205, 207].

pYV имеется у 50-90% свежевыделенных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, но может быть утеряна микробной клеткой в процессе культивирования [156]. Наличие pYV у *Y. pseudotuberculosis* может быть подтверждено генетическими методами исследования, фенотипическими тестами [30, 54, 58, 59, 110, 156] или биопробой на морских свинках [25, 59, 79, 85, 110] и белых мышях [25, 59, 79]. Наиболее часто используют следующие фенотипические тесты вирулентности *Y. pseudotuberculosis*: 1) аутоагглютинация на среде Кларка [30, 54, 58, 59, 81, 110, 154, 156]; 2) слабый рост на плотных питательных средах при 37 °С и при дефиците ионов кальция [30, 54, 58, 59, 110, 156]; 3) пигментация колоний при

росте на среде с красителем конго-рот [30, 156]; 4) отсутствие паразинамидазной активности (не зависит от наличия рYV) [30, 154, 156].

### *Серологические методы диагностики псевдотуберкулёза*

Серологическая диагностика псевдотуберкулёза осуществляется путём индикации антител и антигенов микроба. Для этого применяются следующие методы диагностики: реакция агглютинации (РА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция коагглютинации (РКА), реакция латексагглютинации (РЛА), метод флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментный анализ (ИФА) и дот-иммуноанализ (ДИА) [25, 54, 58, 59, 78, 79, 81, 104, 109, 110].

РА позволяет обнаруживать только антитела. Коммерческие антигенные препараты 1 и 3 серовариантов для РА в настоящее время выпускает ФБУН НИИЭМ им. Пастера (Россия). Однако для определения антител к другим серовариантам псевдотуберкулёзного микроба необходимо иметь в лаборатории соответствующие эталонные иерсиниозные культуры, из которых перед постановкой реакции готовятся корпускулярные антигены. Это значительно затрудняет применение данного метода в лабораториях, осуществляющих диагностику псевдотуберкулёза. Диагностический титр у больных псевдотуберкулёзом в РА составляет 1:160 и выше, т. е. реакция не является высокочувствительной [25, 29, 30, 54, 58, 59, 78, 79, 81, 85, 104, 109, 110, 198].

РНГА в диагностике псевдотуберкулёза нашла применение только для обнаружения антител. ФГУП СПБНИИВС ФМБА РФ производит диагностикум эритроцитарный псевдотуберкулёзный антигенный для РНГА, сухой под торговой маркой БЕРЛЕЗ®. Препарат создан на основе полисахаридных антигенов *Y. pseudotuberculosis* I сероварианта. Это ставит под сомнение возможность его применения в ветеринарии, т. к. от животных в большинстве случаев выделяется псевдотуберкулёзный микроб III сероварианта. Диагностический титр при использовании данного препарата

макрометодом незначителен и составляет 1:200 и выше. Хотя следует отметить, что потенциал чувствительности РНГА значительно превышает РА [25, 29, 30, 46, 54, 56, 58, 59, 78, 79, 81, 83, 84, 85, 104, 109, 110, 184].

РКА и РЛА предназначены для обнаружения растворимых антигенов. Данные реакции хорошо зарекомендовали себя при исследовании копрофильтратов на ранних стадиях заболевания острой формой псевдотуберкулёза. Эффективность РКА в этом случае составляет 65%, а чувствительность –  $10^5$  м.к./мл. Эффективность РЛА – 73%, чувствительность –  $10^6$  м.к./мл. Однако использование латекса несколько увеличивает стоимость диагностического препарата. В целом обе реакции характеризуются быстротой и простотой постановки, не требовательностью к оборудованию лаборатории, низким расходом гипериммунной сыворотки, невысокой себестоимостью. Был создан целый ряд диагностических препаратов для РКА и РЛА на основе гипериммунных псевдотуберкулёзных сывороток, для получения которых проводилась иммунизация кроликов микробными клетками или ЛПС. В настоящее время ФГУП СПБНИИВС ФМБА РФ производит диагностикум латексный для выявления *Y. pseudotuberculosis* иммуноглобулиновый, жидкий под торговой маркой ПСЕВЛАТ [25, 30, 54, 58, 78, 79, 81, 84, 104].

Для определения целых псевдотуберкулёзных клеток в фекалиях и патологическом материале используют прямой вариант МФА. Чувствительность метода составляет  $10^5$  м.к./мл, время постановки – до 2 часов. Для проведения МФА лаборатория должна иметь люминесцентный микроскоп и иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулёзные адсорбированные лошадиные, сухие, производства ФКУН РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора [25, 78, 79, 81, 83, 84, 110].

ИФА является на сегодняшний день наиболее популярным методом серологической диагностики. Он отличается быстротой проведения теста, высокой специфичностью и чувствительностью, возможностью аппаратурной фиксации результата [29]. Существует много разновидностей ИФА, из которых

наиболее распространённым является твёрдофазный вариант, проводимый на планшетах [30, 60, 78, 79, 92].

В диагностике псевдотуберкулёза ИФА используется для обнаружения антител и антигенов возбудителя. Существует ряд отечественных и зарубежных коммерческих иммуноферментных тест-систем, позволяющих проводить индикацию антител к энтеропатогенным иерсиниям. Отечественными производителями таких тест-систем являются: ООО "Омникс" из Санкт-Петербурга [87, 184] и ЗАО "Вектор-Бест" из Новосибирска [56, 58, 87]. За рубежом аналогичные тест-системы производят: MIKROGEN GmbH (Нойрид, Германия) [176, 198]. Предлагаемые препараты созданы на основе рекомбинантных или высокоочищенных белков наружной мембраны иерсиний (*Yops*) родовой специфичности. Данные белки обеспечивают вирулентность *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Производитель может сорбировать на микропланшете один или несколько белков [58, 87, 176, 198]. В каждой тест-системе антитела могут быть определены качественно или количественно. Однако тест-системы не позволяют дифференцировать псевдотуберкулёзную инфекцию от кишечной иерсиниозной [56, 58, 87, 198]. Все тест-системы используют непрямой вариант ИФА. Большинство тест-систем определяют отдельно иммуноглобулины классов G, A, M (IgG, IgA, IgM) [56, 58, 59, 87, 176, 198]. Возможность определять классы иммуноглобулинов повышает информативность анализа, но приводит к необходимости наличия в лаборатории трёх тест-систем. Тест-систему, определяющую IgM, рекомендуют использовать на начальной стадии остро протекающей инфекции, а определение IgG и IgA проводят в случае хронической или перенесённой инфекций [29]. Реже в лабораторной практике используются коммерческие тест-системы, позволяющие обнаружить сразу все классы иммуноглобулинов. Например, тест-система PIGTYPE® YOPSCREEN производства Labor Diagnostic Leipzig (LDL) (Лейпциг, Германия) [181, 190]. Дифференцировать псевдотуберкулёзную инфекцию от кишечной иерсиниозной можно, используя в комплексе с вышеназванными родоспецифичными тест-системами

кишечноиерсиниозные иммуноферментные планшетные тест-системы производства EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Любек, Германия) [29]. Несмотря на отсутствие видоспецифических коммерческих псевдотуберкулёзных антигенных иммуноферментных тест-систем активно проводится создание видо- [4, 6, 87], родо- [87, 117, 189] и типоспецифических [29, 77, 116, 189, 225] экспериментальных препаратов.

В настоящее время существует ряд экспериментальных [7, 30, 47, 48, 53, 78, 79, 86, 104, 111, 147, 163] и одна коммерческая [29, 30, 54, 58, 59, 79, 81, 104, 184] иммуноферментная тест-система для индикации псевдотуберкулёзных антигенов. В них используются поликлональные [7, 30, 47, 48, 79, 104, 111] и моноклональные [53, 147] антитела, полученные в результате воздействия липополисахаридных [30, 79, 104] или белковых [7, 30, 48, 53, 79, 104] антигенов родовой [30, 48, 104], видовой [30, 104], типовой [7, 30, 47, 53, 104, 111, 147] специфичности. Очистка данных антигенов перед иммунизацией значительно повышает себестоимость диагностических препаратов [29]. Экспериментальные тест-системы используют прямой [7, 47, 53, 104, 111, 147] или непрямой [74] варианты твёрдофазного ИФА. У обоих методов есть свои недостатки. В первом методе специфические антитела конъюгируются с ферментом, теряя при этом часть своей активности. Во втором – приходится использовать иерсиниозные сыворотки от двух видов лабораторных животных [92]. Чувствительность создаваемых антительных иммуноферментных тест-систем составляет  $10^3$ - $10^6$  м.к./мл [7, 30, 47, 48, 53, 79, 104, 111, 147], эффективность – 73-100% [7, 29, 30, 47, 54, 79, 104]. При индикации возбудителя эффективность ИФА превышает эффективность бактериологического метода на 47% [30, 54, 79]. Успешно конкурировать с ИФА по эффективности может ПЦР. Однако последний тест требует значительно больших затрат на приобретение оборудования и очень требователен к подготовке образцов для исследования [54, 79]. Значительным недостатком существующей коммерческой иммуноферментной тест-системы является её ориентированность на определение только 1 сероварианта

псевдотуберкулёзного микроба [29, 30, 54, 58, 59, 81, 184], тогда как у животных циркулирует преимущественно 3 серовариант микроба.

Несмотря на то, что планшетный ИФА не требует значительных финансовых вложений в оборудование. Приобретение даже иммуноферментного анализатора для многих районных ветеринарных лабораторий является большой проблемой. Поэтому значительные перспективы имеет такой малозатратный метод лабораторной диагностики, как ДИА [39, 44]. Он относится к хроматографическим тестам и проводится на нитроцеллюлозной мембране. Диаметр пор мембраны зависит от размера определяемых молекул. Для крупных молекул он составляет 0,45 мкм, а для мелких – 0,1 мкм [39, 44, 134, 135, 144, 193, 196, 202, 203, 213, 219]. Реже используют мембраны с более крупными порами [137, 145, 186]. Исследуемый материал наносится на мембрану в виде пятен и подсушивается. Вся незанятая антигеном поверхность мембраны блокируется бычьим сывороточным альбумином [112, 133, 134, 135, 136, 137, 175, 186, 193, 196, 203, 213, 219] или обезжиренным сухим молоком [44, 160, 208]. Определяемые антигены могут иметь белковую [202], углеводную [133, 136, 193], липидную [135], нуклеотидную [134] природу. Также ДИА используют для определения целых вирусов [144, 213, 219] и бактериальных клеток [44, 111, 112, 137, 203]. Кроме антигена в ДИА можно определять антитела [39, 135, 136, 145, 160, 175, 196, 208]. Если для обнаружения антигена используют прямой вариант ДИА, то на фиксированный антиген наносят конъюгированные с индикатором первичные антитела [44, 111, 112, 133, 144, 186, 193, 213]. В случае постановки непрямого ДИА последовательно применяют не меченные первичные антитела и конъюгаты индикаторных молекул с вторичными антителами [137, 160, 219], белком А стафилококка [135, 136, 175, 177, 196, 203, 208] или белком G стрептококка [39, 202]. ДИА можно проводить с поликлональными [39, 44, 111, 133, 137, 144, 187, 193, 203, 219] и моноклональными [112, 186, 213] антителами. В целях экономии раствора антител инкубацию мембран можно проводить в мешочках из плёнки [134, 137, 177]. Индикаторами,



позволяющими проводить визуальный учёт реакции, могут являться ферментные метки [111], благородные металлы [44, 137, 177], коллоидный углерод [39] и др.

Наиболее часто в качестве индикатора используют ЗНЧ. Преимущественно используют ЗНЧ сферической формы диаметром 12-37 нм [112, 133, 134, 135, 136, 137, 144, 145, 160, 175, 186, 193, 196, 203, 208, 213, 219], реже в виде стержней [177]. Положительную реакцию наблюдают через час в виде красных пятен [177]. ДИА с ЗНЧ подходит для исследований фекалий [137, 219] и пищевых продуктов [112]. Он был успешно испытан для индикации *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* [38], а также родственных им бактерий из родов: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* [112, 137]. Из оборудования для проведения ДИА с ЗНЧ нужен только термостатируемый шейкер. По своей чувствительности метод не уступает РНГА [143, 145], планшетному [133, 137, 143, 145, 186] и мембранному [143, 196, 213] ИФА. Он достаточно прост, быстр, не требует значительного расхода реактивов и хорошо подходит для массовых исследований.

#### *Молекулярно-генетический метод диагностики псевдотуберкулёза*

Из данной группы методов для определения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) энтеропатогенных иерсиний наиболее часто используется метод ПЦР. Метод отличается быстротой выполнения (5-6 часов), а также высокой чувствительностью и специфичностью [29, 30, 31, 54, 79]. Однако эффективность метода во многом зависит от качества подготовки исследуемого образца, а именно удаление ингибиторов реакции и выделения ДНК. Ингибиторами ПЦР являются биологические агенты деградации тканей, ферменты, полисахариды и т.п. Их наличие в образце приводит к ложноотрицательным результатам [29, 30, 54, 58, 79]. Также ПЦР требует наличия в лаборатории дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала [54]. ПЦР достаточно часто используется для обнаружения ДНК энтеропатогенных иерсиний в

патологическом материале и пищевых продуктах. Она позволяет определять хромосомные [29, 54, 56, 58, 59, 79, 87, 90, 107, 149, 167, 181, 184, 190, 205, 207, 209] и плазмидные [29, 54, 58, 59, 79, 87, 107, 149, 152, 154, 179, 190, 205, 207] гены, ответственные за синтез маркеров вирулентности иерсиний [29, 54, 56, 58, 59, 79, 87, 107, 149, 152, 154, 181, 184, 190, 205, 207], белков видовой [29, 54, 56, 58, 59, 79, 87, 90, 107, 149, 167, 179, 190, 205, 207] и родовой специфичности [29, 54, 58, 59, 79, 87, 90, 152, 154, 179, 190, 205, 207, 209], а также плазмидный состав [29, 56, 59, 184] и O-серогенотип возбудителя [29, 56, 59, 107, 149, 184, 209]. ПЦР и ИФА могут выступать сигнальными методами при исследовании сред накопления, что значительно повышает эффективность бактериологического метода диагностики [27, 31, 54].

Таким образом, анализируя материал, изложенный в данном разделе, можно прийти к выводу, что ассортимент коммерческих препаратов, производимых для диагностики псевдотуберкулёза в России и за её рубежами, недостаточен. Особенно тяжёлая ситуация складывается с антительными тест-системами. Существующие диагностические препараты не адаптированы для ветеринарных целей. Бактериологический метод диагностики трудоёмок, длителен и недостаточно эффективен. Это требует для повышения эффективности лабораторной диагностики дополнять его серологическими и генетическими тестами, направленными на обнаружение бактерий в средах накопления. Молекулярно-генетические методы диагностики не пригодны для применения в слабо оснащённых ветеринарных лабораториях, что приводит к необходимости разработки антительных тест-систем.

### **1.3. Антигенные свойства возбудителя псевдотуберкулёза**

В настоящее время к роду *Yersinia* относят 17 видов бактерий. Патогенными для теплокровных животных являются 3 вида иерсиний: *Y. pestis* (возбудитель чумы), *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* (возбудитель кишечного иерсиниоза). Более 13 видов иерсиний являются непатогенными. А *Y. ruckeri* может поражать только рыбу. Антигенные различия существуют как

между отдельными видами иерсиний, так внутри каждого вида. Что позволяет выделять внутривидовые сероварианты бактерий. Известен 21 серовариант *Y. pseudotuberculosis*: O:1a, O:1b, O:1c, O:2a, O:2b, O:2c, O:3, O:4a, O:4b, O:5a, O:5b, O:6, O:7, O:8, O:9, O:10, O:11, O:12, O:13, O:14, O:15. А также ряд несеротипируемых штаммов данного микроба. Наибольшее значение в качестве патогенов для человека и животных представляют 12 сероваров *Y. pseudotuberculosis*: O:1a, O:1b, O:1c, O:2a, O:2b, O:2c, O:3, O:4a, O:4b, O:5a, O:5b, O:7. Серовары O:6 и O:8-O:15 являются сапрофитами. Они преимущественно выделяются из окружающей среды. В основу деления *Y. pseudotuberculosis* на сероварианты положены различия по липополисахаридному антигену [29, 58, 78, 79, 100, 105, 209].

Антигены *Y. pseudotuberculosis* могут находиться в клеточной стенке бактерии в виде белковых или липополисахаридных структур, а также в специальных органеллах: фимбриях, жгутиках, капсуле. Они часто определяют вирулентные свойства бактериальных штаммов [78, 79, 105].

Синтез белковых антигенов *Y. pseudotuberculosis* может быть связан с наличием генов нуклеоидной (хромосомной) или плазмидной локализаций. Плазмидные гены вызывают экспрессию белков только в случае роста микроба при температуре 37 °С. Что имитирует температуру тела теплокровного хозяина. Белковые антигены плазмидной детерминации, как правило, являются факторами патогенности. Поэтому кодирующая их плазида называется рYV с м. м. 42-47 МДа. Она часто встречается в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, выделенных от больных животных, и легко теряется при культивировании микробов на питательных средах. Белковые антигены, связанные с нуклеодными генами, преобладают на иерсиниях, выращенных при температуре 30 °С и ниже. Они не всегда являются факторами патогенности. Определение отдельных антигенов нуклеодного или плазмидного происхождения позволяет одновременно идентифицировать вид микроба и его вирулентность без постановки биопробы. Детекция белковых антигенов *Y. pseudotuberculosis* в хорошо оснащённых лабораториях редко проводится

серологическими методами. Данные антигены легче обнаружить через наличие в клеточном геноме кодирующих их нуклеотидных последовательностей посредством ПЦР [78, 79, 105, 204].

Группа белков, кодируемых *pYV*, носит название белков *Yop*. Они образуются посредством аппарата секреции III типа энтеропатогенных иерсиний. Эти белки после синтеза переносятся в цитоплазму эукариотической клетки, нейтрализуют последнюю и блокируют синтез цитокинов. Что позволяет псевдотуберкулёзному микробу успешно противостоять макрофагам, проникать в них и даже размножаться здесь. Всего известно 12 эффекторных *Yop*, которые делятся на 2 группы. Шесть белков *Yop* образуют канал между иерсинией и эукариотической клеткой (*YopB* (42 кДа), *YopD* (33 кДа), *YopN* (33 кДа), *YopR* (18 кДа), *YopK* (21 кДа), *LcrV* (37 кДа)), по которому внутрь эукариотической клетки переносятся оставшиеся шесть разновидностей *Yop* (*YpkA* (82 кДа), *YopE* (23 кДа), *YopH* (51 кДа), *YopJ* (33 кДа), *YopM* (42 кДа), *YopT* (36 кДа)). В процессе секреции и переноса *Yop* участвуют более мелкие белки-помощники, которые носят название чаперонов (*Sys*). Для каждого *Yop* имеется свой *Sys*. Всего в процессе секреции III типа участвует 29 белков (*Ysc*) [21, 105, 118, 132, 146, 156, 204].

Белки *YpkA*, *YopE*, *YopT* деполимеризуют актин внутри эукариотической клетки, оказывая на последнюю цитотоксический эффект. *YopH* блокируют поглощение бактерии фагоцитом и вызывают апоптоз макрофага. *YopJ* нарушают экспрессию провоспалительных цитокинов [45, 105].

Следует помнить, что получить *Ysc* можно только в случае культивирования *Y. pseudotuberculosis* при температуре 37 °C в условиях дефицита ионов  $Ca^{2+}$  в питательной среде и при наличии *pYV*. Аналогичные условия культивирования необходимы для получения белка *YadA* (200 кДа), липопротеина *YlpA* (с протеиновой частью 24 кДа). Оба антигена кодируются *pYV* и присутствуют у обеих энтеропатогенных иерсиний. *YadA* отвечает за адгезию и инвазию бактерий к эукариотической клетке, а *YlpA* защищает

иерсиний от фагоцитоза и бактерицидных веществ сыворотки крови [45, 96, 105, 118, 128, 139, 156, 204, 220].

Псевдотуберкулёзный микроб обладает рядом белковых антигенов детерминированных нуклеоидом и синтезируемых при пониженных температурах. К таким антигенам относят белок инвазин (Inv), адгезин (Ail), антиген рН 6 (PsaA), суперантиген (Ypm), термостабильный токсин (ТСТ, Yst), термолабильный токсин (ТЛТ) [96, 97, 105, 118].

Inv находится в клеточной стенке энтеропатогенных иерсиний и отвечает за адсорбцию и проникновение патогена внутрь клетки хозяина. Размер и строение данного белка у иерсиний разных видов отличается. М. м. псевдотуберкулёзного Inv составляет 103 кДа [45, 105, 118, 156, 191].

Белок Ail с массой 17 кДа кодируется хромосомным геном. Его синтез не зависит от температуры культивирования микроба. Данный антиген *Y. pseudotuberculosis* в отличие от аналогичного белка *Y. enterocolitica* не обладает адгезивной и инвазивной способностью. Однако повышает резистентность иерсиний к бактерицидному действию сыворотки крови [105, 118, 156, 191].

PsaA имеется также у *Y. pestis*. Он синтезируется на поверхности клеточной стенки при низких значениях рН окружающей среды [105, 118, 156, 191].

Ypm имеется у штаммов *Y. pseudotuberculosis*, вызывающих дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку, определяя тяжёлое течение псевдотуберкулёзной инфекции на Дальнем Востоке, Сибири, Японии. Территория, на которой выделен микроб, и его серовариант являются основными факторами присутствия Ypm. Например, штаммы *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта, выделенные от людей на Дальнем Востоке в 100% случаев содержали Ypm, выделенные в Японии – 95%, в Европе – 13%. Кроме O:3 сероварианта псевдотуберкулёзного микроба Ypm можно обнаружить в сероварах O:1b, O:2a, O:2b, O:2c, O:4a, O:4b, O:5a и O:5b. Ypm находится в клеточной стенке *Y. pseudotuberculosis* и вызывает

неспецифическую гиперстимуляцию иммунных клеток, приводящую к повреждению тканей макроорганизма. Существует 3 типа Ypm: А, В, С. Ypm А имеет м. м. 15 кДа и встречается у 83% штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных от больных людей, грызунов и окружающей среды. Тогда как Ypm В и Ypm С представлены в 5% и 12% штаммов соответственно [30, 45, 105, 114, 124, 155, 156, 185, 191].

ТСТ продуцируется большей частью штаммов *Y. pseudotuberculosis* и имеет м. м. 45 кДа. Он обладает полиорганным дистрофически-деструктивным действием, снижает активность нейтрофилов и макрофагов, а также угнетает антителогенез. ТСТ обладает антигенными и протективными свойствами. Данный белок термоустойчив и не разрушается от воздействия 1%-го додецилсульфата натрия (SDS). Синтез ТСТ не зависит от температуры культивирования [32, 45, 93, 156, 191].

ТЛТ с м. м. 200 кДа синтезируется *Y. pseudotuberculosis* I, II, IV, V сероваров только внутри тела хозяина. Обладает иммуногенным и аллергенным действием, а также поражает эндотелий микрососудов и клетки паренхиматозных органов. Результатом деструктивного действия ТЛТ на ткани является дистрофические и некротические изменения печени и почек. ТЛТ свойственна видовая специфичность [71, 103].

Белки-порины с м. м. 35-40 кДа являются доминирующими белками иерсиний и образуют поры в клеточной стенке, через которые внутрь клетки поступают питательные вещества, а наружу выделяются метаболиты. Порины чрезвычайно стабильны. Внутренняя поверхность, образуемых ими каналов, имеет гидрофильные свойства, а наружная – гидрофобные. Разрушение их структуры не происходит при воздействии малых концентраций SDS (до 30%) и мочевины. Порины регулируют проницаемость клеточной стенки в зависимости от условий внешней среды и не обладают токсичными свойствами. Они могут обладать родо- и видоспецифическими антигенными свойствами [8, 18, 68, 76, 100, 120].

При температуре 30 °С и ниже псевдотуберкулёзный микроб образует жгутики. Белки жгутиков представляют собой Н-антиген. Данный антиген сходен у многих представителей кишечной группы бактерий, поэтому диагностического значения не имеет [79].

Кроме белковых антигенов значительную роль иммунных реакциях и патогенезе псевдотуберкулёза играет ЛПС. На основе ЛПС создано подавляющее большинство диагностических псевдотуберкулёзных препаратов, что связано с высокой специфичностью данной структуры. Однако получение антител к ЛПС затруднительно из-за его высокой токсичности для теплокровных животных. Общая структура ЛПС *Y. pseudotuberculosis* сходна с таковой у всех грамотрицательных бактерий. Располагается ЛПС во внешнем слое клеточной стенки, занимая около 70% ее поверхности. Молекула ЛПС состоит из гидрофобного липида А, олигосахарида кора и О-полисахаридной цепи [9, 14, 78, 123, 156, 162, 197].

О-полисахаридная цепь полностью выступает над поверхностью клеточной стенки, имеет неповторимую структуру и отвечает за специфичность ЛПС. Олигосахарид в О-цепи может повторяться до 24-26 раз. Данный олигосахарид состоит из 4-5 моносахаридов, образующих разветвлённую структуру. Природа моносахаридов и их взаимное соединение зависят от сероварианта псевдотуберкулёзного микроба. Такая структура ЛПС характерна для S-формы *Y. pseudotuberculosis*. Микробные клетки, выросшие в R-форме, утрачивают О-полисахаридную цепь или имеют её значительно укороченный вариант. Это значительно снижает вирулентные и антигенные свойства псевдотуберкулёзного микроба. О-полисахарид *Y. pseudotuberculosis* содержит 22 антигенных центра [9, 14, 57, 65, 119, 123, 162, 197].

Кор у грамотрицательных бактерий достаточно консервативен. Антитела, полученные к кору, взаимодействуют с ЛПС многих видов грамотрицательных бактерий. Он соединяет липид А с О-полисахаридной цепью. Область кора *Y. pseudotuberculosis*, обращённая наружу, представлена гексозным олигосахаридом, а внутренняя – состоит из L-глицеро-D-манногептозы и

молекул 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) [65, 119, 123, 141, 162, 178].

Липид А погружен в наружный слой внешнего мембранного бислоя и обладает ярко выраженной токсичностью. Это наиболее консервативная часть ЛПС. У *Y. pseudotuberculosis* он представляет собой дисахарид с двумя фосфатными остатками, замещенный по аминогруппам двумя остатками 3-гидрокситетрадекановой кислоты, а по гидроксильным группам – остатками 3-гидрокситетрадекановой и додекановой жирных кислот. Липид А имеет 3 антигенных центра, которые в обычных условиях экранируются полисахаридными цепями. Учёным удалось получить антитела к липиду А, которые из-за его консервативности имели низкую специфичность [3, 9, 45, 65, 119, 123, 127, 139, 141, 159, 162, 169].

Биологическая активность ЛПС во многом зависит от способа его выделения из клеточной стенки микроба. Наиболее перспективным и часто используемым методом выделения является водно-фенольная экстракция. При выделении ЛПС часто образует комплексы с белками-поринами [12, 18, 23, 89, 215].

Помимо ЛПС в клеточной стенке всех грамотрицательных бактерий содержится общий антиген энтеробактерий (ЕСА), который также состоит из повторяющегося трёхсахарного олигосахаридов. ЕСА не токсичен. Максимальной его синтез происходит при температуре 22 °С. Для получения антител к ЕСА требуется присутствие белка. Антитела обладают слабой специфичностью [125, 164, 188, 195].

Капсула *Y. pseudotuberculosis* также содержит антиген, представленный протеингликолипидом, который сходен с аналогичным антигеном *Y. pestis*. Он обладает токсичностью и термолабильностью. Наиболее массивную капсулу микроб образует при пониженных температурах, однако при центрифугировании бактерия полностью её теряет [35, 78].

Антигенные связи *Y. pseudotuberculosis* с представителями из других родов кишечной группы бактерий, а также *Y. enterocolitica* выражены слабо.



Однако наблюдается некоторое сродство с возбудителем чумы [30, 37, 58, 79, 81, 105].

Подводя итог ко всему вышесказанному, можно сделать вывод, что *Y. pseudotuberculosis* обладает значительным количеством антигенов видовой и родовой специфичности. Большая часть из которых расположена в клеточной стенке. Некоторые антигены проявляют достаточную устойчивость к воздействию даже таких сильных детергентов как SDS. Однако синтез антигенов в значительной мере зависит от температуры культивирования иерсиний. Этот фактор необходимо учитывать при получении отдельных видов антигенов. Выделенные антигены могут быть направлены на создание диагностических препаратов и иммунизацию животных.

#### **1.4. Адьюванты для иммунизации животных**

Для усиления специфического действия антигена в организме животного используют адьюванты. Их смешивают с антигенами перед введением иммунизируемому животному. К адьювантам относят некоторые минеральные, синтетические, поверхностно-активные вещества, микробные, костномозговые, тимусные компоненты, масла, цитокины, наночастицы, сложные искусственные структуры. Их присутствие в организме снижает скорость деградации антигена и создаёт его "депо" в месте введения. Также адьюванты стимулируют созревание и фагоцитарную активность макрофагов, дифференциацию Т- и В-лимфоцитов, увеличивают выработку антител [33, 52, 72].

Для иммунизации животных наиболее часто используют минеральные и масляные адьюванты. Самым эффективным в данных группах адьювантов является ПАФ. Он содержит в своём составе минеральное масло, поверхностно-активное вещество (моноолеат маннида) и клетки инактивированной туберкулёзной палочки. ПАФ способствует возникновению сбалансированного гуморально-клеточного иммунитета и является "золотым стандартом" среди

адьювантов. Однако он вызывает в месте иммунизации сильный воспалительный процесс, сопровождающийся болезненностью, образованием абсцессов и гранулём, что ограничивает его использование. Данного недостатка лишён неполный адьювант Фрейнда (НАФ). Но в результате отсутствия в его составе микробных клеток, НАФ обладает значительно более слабым иммуностимулирующим действием и создаёт несбалансированный гуморальный иммунитет [151, 200].

В настоящее время для иммунизации животных популярность приобретает применение синтетических адьювантов, которыми могут являться полинуклеотиды, пептиды, гликопептины, липопептиды и полиэлектролиты [52, 72]. Химическая группа полиэлектролитов достаточно обширна, однако только некоторые из них испытаны в качестве адьювантов. К таким соединениям относят:

- поли-4-винилпиридин [22],
- полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода [69],
- сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиния бромид [55],
- полиакриловую кислоту [1, 101],
- декстран-сульфата [121, 165, 201],
- сополимер N-винилпирролидона с акриловой кислотой [2, 17, 70],
- сополимер N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпирридином [99].

Для усиления иммунного ответа необходимо взаимодействие полиэлектролита и антигена [5]. Для белковых антигенов достаточно электростатических взаимодействий с полиэлектролитом в растворе [34, 43, 63, 72], а для полисахаридных антигенов необходимо образование ковалентной связи с полиэлектролитным адьювантом [64]. Полиэлектролиты стимулируют макрофагов [72, 99], Т- и В-лимфоциты [15, 16, 17, 22, 43, 49, 72, 101], увеличивают титры специфических антител [49, 70, 72, 101], снижают иммунологическую толерантность [102], усиливают напряжённость и длительность иммунитета [72, 140, 201]. Воспалительные процессы в месте

введения полиэлектролитов умеренные. Иммуитет, вызванный применением полиэлектролитов, как правило, сбалансированный гуморально-клеточный [2, 49, 72, 70, 101, 165]. Титры антител в ряде случаев не уступают по величине титрам, возникающим после использования ПАФ [34, 63, 72].

В качестве примеров коммерческого применения полиэлектролитных адьювантов могут служить:

- сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксии)-1,4-этиленпиперазиния бромида (полиоксидоний) [55, 73, 91],

- сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (совидон) [61, 99].

Данные соединения входят в качестве адьювантов в составы коммерческих отечественных вакцин против гриппа А. Полиоксидоний включён в состав вакцины "Гриппол-плюс" производства "НПО Петровакс Фарм" [33, 36, 49, 50], а совидон – в состав вакцины "Совигрипп" производства АО "НПО "Микроген" [10, 33, 62].

В 2015 году впервые в качестве адьюванта для вакцин был предложен ПААГ, который использовался в комплексе с микрочастицами карбоната кальция [69]. Ранее данное вещество применялось в качестве бактерицидного средства при очистке воды и консервировании пищевых продуктов [11, 13, 66]. В опытах на мышах, крысах и КРС была доказана его безопасность для организма животных [67, 69, 82]. Это послужило причиной проведения нами исследований по возможности применения ПААГ в качестве адьюванта для гипериммунизации лабораторных животных.

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и методы исследований

#### *Бактериальные штаммы*

При проведении исследований использовали музейные штаммы иерсиний: *Yersinia pseudotuberculosis* I O:1 сероварианта, *Yersinia pseudotuberculosis* III O:3 сероварианта, *Yersinia pseudotuberculosis* IV O:4 сероварианта, *Yersinia pseudotuberculosis* V O:5 сероварианта, *Yersinia enterocolitica* 66-82 O:3 сероварианта, *Yersinia enterocolitica* 383 O:9 сероварианта, *Enterobacter aerogenes* ATCC-13048, *Escherichia coli* 4295, *Proteus vulgaris* 19, *Salmonella typhimurium* 1626, полученные из ГКПМ ФКУН РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора.

В опытах также использовали штаммы бактерий, ранее выделенные от сельскохозяйственных животных: *Yersinia pseudotuberculosis* штаммов №13, №40, №67, *Yersinia enterocolitica* штамма №58, *Klebsiella pneumoniae* K-25. Все штаммы иерсиний, выделенных от сельскохозяйственных животных, относятся к O:3 серовариантам.

Штаммы *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенные нами в ходе проведённых исследований представлены в разделах 2.2.10. и 2.2.11.

Для получения бактериальных взвесей культуры энтеропатогенных иерсиний выращивали на мясопептонном агаре (МПА) при 26 °С 48 часов, а культуры остальных бактерий – при 37 °С в течение 24 часов.

Постановку иммунологических реакций проводили с использованием формализированных клеток микроорганизмов. Выращенную на МПА бактериальную массу отмывали от питательной среды в 0,1 М ФСБ pH=7,2-7,4 центрифугированием при 6 тыс. об./мин. в течение 10 минут не менее двух раз. Отмытые микробные клетки выдерживали в 1%-м формалине в течение 12 часов при 20 °С. Контроль их стерильности осуществляли путем посева взвеси на МПА и последующего наблюдения за посевами на протяжении двух суток.

Перед использованием формализированную взвесь бактерий два раза отмывали от формалина 0,1 М ФСБ рН=7,2-7,4.

Бактериальные взвеси с концентрацией  $10^9$  м.к./мл и  $10^{10}$  м.к./мл готовили на 0,1 М ФСБ рН=7,2-7,4. Для контроля концентрации взвесей использовали оптический стандарт мутности БАК-10 (бактерий кишечной группы –  $0,93 \cdot 10^9$  м.к./мл, бруцелл –  $1,7 \cdot 10^9$  м.к./мл) пр-ва ООО "ОРМЕТ", г. Екатеринбург, а также высевы на плотные питательные среды Эндо и МПА.

### *Животные*

Дыхательную активность перитониальных макрофагов определяли на 45 беспородных белых мышах массой 20-22 г.

Гипериммунные сыворотки к ДМ и ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, были получены после иммунизации 29 кроликов породы "Шиншилла" массой 2,5-3 кг и 5 морских свинок массой 400-500 г. Животные содержались в условиях стационара ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Фекалии для испытания созданных тест-систем получали от 10 свиней породы "Русская белая" в возрасте от 6 месяцев до 3 лет, содержащихся в стационаре ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Эксперименты с лабораторными животными проводились в соответствии с законом РФ от 1.01.1997 г "О защите животных от жестокого обращения" и Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г).

Для выделения *Y. pseudotuberculosis* исследовали 420 поросят и 370 месячных телят 2-5 месячного возраста, содержащихся в условиях животноводческих хозяйств Саратовской области.

### *Оборудование*

При проведении исследований использовано современное оборудование: центрифуга лабораторная Eppendorf Centrifuge 5920 R, фирмы "Eppendorf" (Германия); центрифуга лабораторная Sigma-202MK Refrigerated, фирмы "Sigma" (США); ультразвуковой дезинтегратор UD-11, фирмы "Techpan" (Польша); рН-метр рН-150МИ, фирмы ООО "Измерительная техника" (Россия); спектрофотометр Genesys 10S UV-Vis, фирмы "Thermo Fisher Scientific, Inc." (США); планшетный фотометр Thermo Scientific, Multiskan FC фирмы "Thermo Fisher Scientific, Inc." (США); поляризационно-интерференционный микроскоп Biolar PI, фирмы "PZO" (Польша); анализатор гематологический Micro CC-20 Plus, фирмы "High Technology, Inc." (США); аналитические весы Explorer Pro EP214C, фирмы "Ohaus Europe" (Швейцария); лабораторные электронные весы AND HL-200i, пр-ва A&D (Япония); модульный шейкер-инкубатор Unimax 1010-Inkubator 1000, пр-ва Heidolph (Германия); лиофильная сушка ScanVac CoolSafe Basic 55-4, фирмы LaboGene (Дания); термостаты электрические суховоздушные типа ТС-1/80 СПУ, производства "ОАО Смоленское СКТБ СПУ" (Россия) и другие приборы.

### *Химические реактивы и расходные материалы*

В исследованиях использовали следующие реактивы:

1. Реактивы отечественного производства химически чистые и чистые для анализа соответствующие ГОСТ.
2. Импортные реактивы производства фирмам: "Serva" и "Merck" (Германия); "Sigma" (США); "Pharmacia" (Швеция) и "Fluka" (Швейцария).

В качестве твердофазного носителя в ИФА использовали 96-луночные полистироловые планшеты, производства фирмы "Jet Biofil" (Китай). В ДИА реагенты наносили нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,2 мкм производства фирмы "Merck" (Германия).

Для диализа применяли диализный мешок ТЗ с размером пор 12-14 кДа производства "Orange Scientific" (Бельгия).

### *Растворы*

#### *Фосфатно-солевой буферный раствор с рН=7,2-7,4 (ФСБ рН=7,2-7,4)*

Смешивали 810 мл раствора А (14,2 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , растворенные в 1 литре дистиллированной воды) и 190 мл раствора Б (7,8 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , растворенные в 0,5 литрах дистиллированной воды). Доводили рН до 7,2-7,4 добавлением раствора А, если рН надо сдвинуть в щелочную сторону или раствора Б, если рН надо сдвинуть в кислую сторону.

Перед использованием готовили 0,01 М ФСБ рН=7,2-7,4. Для этого к 100 мл 0,1 М ФСБ рН=7,2-7,4 добавляли 900 мл дистиллированной воды.

#### *ФСБ рН=7,2-7,4 с твином-20 (ФСБ-Т рН=7,2-7,4)*

0,5 мл твина-20 вносили в 1 литр ФСБ рН=7,2-7,4

#### *Карбонатно-бикарбонатный буферный раствор с рН=9,2-9,4 (КББ рН=9,2-9,4)*

Смешивали 270 мл раствора А (25,14 г  $\text{NaHCO}_3$ , растворенные в 3 литрах дистиллированной воды) и 30 мл раствора Б (5,29 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , растворенные в 0,5 литрах дистиллированной воды). Доводили рН до значения 9,2-9,4.

Перед использованием готовили 0,01 М КББ рН=9,2-9,4: к 100 мл 0,1 М КББ рН=9,2-9,4 добавляли 900 мл дистиллированной воды.

#### *Цитратно-фосфатный буферный раствор с рН=5,0-5,2 (ЦФБ рН=5,0-5,2)*

0,96 г лимонной кислоты и 1,78 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  растворяли в 25 мл дистиллированной воды.

### *Субстратная смесь*

В 25 мл ЦФБ рН=5,0-5,2 растворяли 0,03 г ортофенилдиамина и добавляли к раствору 0,5 мл 3%-й перекиси водорода. Смесь готовили за 10-15 минут до использования.

### *Стоп-раствор*

К 25 мл дистиллированной воды добавляли 4,5 мл HCl с содержанием действующего вещества 38%, т. е. готовили 2 н раствор соляной кислоты.

#### *0,3%-й раствор тетразоля бромида голубого*

В 10 мл 0,01 М ФСБ pH=7,2-7,4 растворяли 3 мг тетразоля бромида голубого. Раствор хранили не более 2 недель при 4 °С в темной посуде.

#### *2%-й раствор бычьего сывороточного альбумина (2% БСА)*

В 45 мл 0,01 М ФСБ pH=7,2-7,4 растворяли 0,9 г БСА.

#### *0,5%-й щелочной раствор*

Раствор А (40 г NaOH, растворенные в 100 мл дистиллированной воды) и раствор Б (0,5 г NaCl, растворенные в 100 мл дистиллированной воды) стерилизовали автоклавированием при 121 °С в течение 30 минут. Затем смешивали растворы в пропорции: 9,5 мл 0,5%-го NaCl и 0,13 мл 40%-го NaOH.

### *Питательные среды*

#### *Фосфатно-солевой буферный раствор с pH=7,6-7,8 (ФСБ pH=7,6-7,8)*

##### *для накопления энтеропатогенных иерсиний*

Смешивали 850 мл раствора А (11,87 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в 1 литре дистиллированной воды) и 150 мл раствора Б (4,54 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в 0,5 литрах дистиллированной воды). Полученный раствор разливали в пробирки по 5 мл и стерилизовали автоклавированием при 121 °С в течение 30 минут.

#### *1%-я забуференная пептонная вода (1% ЗПВ)*

Растворяли в 990 мл ФСБ 10 г пептона, полученный раствор разливали в пробирки по 5 мл и стерилизовали автоклавированием при 121 °С в течение 30 минут. Ферментативный пептон использовали производства ООО "Биотехновация" (г. Москва).



Использовали МПА, мясопептонный бульон (МПБ), среду Эндо, полужидкий агар, среду Гисса с глюкозой и среду Кларка, производства ООО "НПЦ БиоКомпас С" (г. Углич).

Применяли Микро-ЛА-Тест ЭНТЕРОтест 24 N производства фирмы "Erba Lachema" (Чехия), а также тесты на индол и оксидазу этой фирмы.

### *Диагностические препараты*

#### *Коммерческие препараты:*

1. Сыворотки диагностические к *Y. enterocolitica* O:3, O:9 серотипов и *Y. pseudotuberculosis* O:1, O:3 серотипов O-моновалентные кроличьи сухие для РА производства ФГУН НИИЭМ им. Пастера.

2. Сыворотки кишечной синиозные O:3, O:9 серотипов и псевдотуберкулёзная из наборов диагностических для РНГА производства ФГУП СПбНИИВС ФМБА России.

3. Сыворотки диагностические эшерихиозные агглютинирующую ОК-поливалентные сухие для РА (ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ), производства ОАО "Биомед" им. И.И. Мечникова.

4. Сыворотка диагностическая сальмонеллёзная адсорбированная поливалентная основных серогрупп (А, В, С, D, Е) для РА производства ФГУП СПбНИИВС ФМБА России.

5. Конъюгат антител козы к иммуноглобулинам IgG, IgA, IgM кролика с пероксидазой хрена, производства ООО фирмы "Имтек", г. Москва.

6. Конъюгат антител козы к иммуноглобулинам IgG, IgA, IgM мыши с пероксидазой хрена, производства ООО фирмы "Имтек", г. Москва.

7. IgG (H&L) против морской свинки поликлональные, полученные от козы, конъюгированные с пероксидазой хрена производства "Sigma" (США).

8. Белок А рекомбинантный сухой, производства ООО фирмы "Имтек", г. Москва.

*Экспериментальные препараты, полученные на кафедре "Микробиология и биотехнология" ФГБОУ ВО Вавиловский университет:*

9. ДМ *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта.
10. ЛПС *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта.
11. Сыворотки диагностические, полученные в ответ на иммунизацию кроликов комплексом ДМ *Y. pseudotuberculosis* O:3 + ПАФ.
12. Сыворотки диагностические, полученные в ответ на иммунизацию кроликов комплексом ЛПС *Y. pseudotuberculosis* O:3 + ПАФ.
13. Сыворотки диагностические, полученные в ответ на иммунизацию кроликов комплексом ДМ *Y. pseudotuberculosis* O:3 + ПААГ.
14. Сыворотки диагностические, полученные в ответ на иммунизацию морских свинок комплексом ДМ *Y. pseudotuberculosis* O:3 + ПААГ.
15. Сыворотки диагностические, полученные в ответ на иммунизацию кроликов комплексом ЛПС *Y. pseudotuberculosis* O:3 + ПААГ.
16. Конъюгат белка А стафилакокка с золотыми наночастицами размером 15 нм, любезно предоставленные ведущим научным сотрудником лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН (г. Саратов), д. б. н. Дыкманом Л.А.

#### *Бактериологический метод диагностики*

С целью обнаружения *Y. pseudotuberculosis* были проведены бактериологические исследования проб фекалий от 420 поросят 2-4 месячного возраста и 370 телят 2-5 месячного возраста, содержащихся в животноводческих хозяйствах Саратовской области. Взятие материала для исследования проводилось из прямой кишки животного с помощью стерильного ватного тампона, который затем помещали в пробирку с ФСБ. ФСБ с фекалиями подвергали "холодовому обогащению", т. е. инкубировали при +4 °С в течение 6 суток.

Высевы с ФСБ осуществляли на 3-и и 6-е сутки бактериологической петлей штрихом на секторы чашки Петри со средой Эндо. Перед посевом

пробы подвергались "щелочной обработке". Для этого в лунки полистироловых планшетов для иммунологических реакций, предварительно стерилизованных этиловым спиртом, помещали по 0,2 мл 0,5%-го щелочного раствора. Затем из верхнего слоя среды накопления отбирали 0,2 мл материала и вносили на 4 минуты в лунки со щелочным раствором. Посевы на среде Эндо инкубировали при 26 °С в течение 48 часов.

Характерные для псевдотуберкулёзного микроба колонии отбирали петлей на питательный бульон, а затем пересеивали на скошенный мясопептонный агар. Все посевы инкубировали при 26 °С по 2 суток. Идентификацию выросших микробных культур осуществляли при помощи световой микроскопии с окраской по методу Грама, диагностических биохимических систем Микро-ЛА-Тест ЭНТЕРОтест 24 N и ориентировочной реакции агглютинации (ОРА) с сыворотками диагностическими к *Y. pseudotuberculosis* O:1, O:3 серовариантов.

*Методы определения морфологических, культуральных, биохимических и вирулентных свойств энтеропатогенных иерсиний*

Морфологию энтеропатогенных иерсиний определяли микроскопией фиксированных и окрашенных по методу Грама бактериальных мазков под увеличением в 1600 раз.

Культуральные признаки энтеропатогенных иерсиний определяли по внешнему виду микробных колоний на плотных питательных средах.

Биохимические свойства энтеропатогенных иерсиний определяли на диагностических биохимических системах Микро-ЛА-Тест ЭНТЕРОтест 24 N и в тестах для обнаружения индола и оксидазы фирмы "Erba Lachema", а также полужидкой среде Гисса с глюкозой. Постановка и оценка биохимических тестов фирмы "Erba Lachema" осуществлялась в соответствии с прилагаемой к ним инструкцией.

Патогенность *Y. pseudotuberculosis*, связанную с плазмидой вирулентности, выявляли в тестах: аутоагглютинации, пигментсорбции, температурозависимости роста колоний.

Для определения способности к аутоагглютинации двухсуточную агаровую культуру *Y. pseudotuberculosis*, выращенную при 26 °С, заседали в пробирки со средой Кларка. Одну пробирку инкубировали при 37 °С, а другую – при 26 °С в течение 2 суток. У патогенных иерсинии наблюдалась агглютинация при 37 °С в виде хлопьев на дне и стенках пробирки.

На МПА, содержащий краситель конго-красный в концентрации 0,05 мг/мл, заседали шпателем 0,1 мл взвеси двухсуточной агаровой культуры *Y. pseudotuberculosis*. Посевы инкубировали 2 суток при 26 °С с последующим выдерживанием их при 4 °С в течение 3 суток. Вирулентные штаммы образовывали мелкие колонии красного цвета, не вирулентные – более крупные бесцветные колонии.

Для определения температурозависимой морфологии колоний культивировали *Y. pseudotuberculosis* 2 суток на двух чашках Петри со МПА. Одну чашку инкубировали при 37 °С, вторую – при 26 °С. Оценку диаметра колоний проводили визуально. При 37 °С вирулентные иерсинии образуют более мелкие, чем при 26 °С колонии (в 1,5-3 раза).

#### *Метод получения ДМ Y. pseudotuberculosis*

Агаровую культуру энтеропатогенных иерсиний заседали поверхность МПА в бактериологических матрасах. Смытую с матрасов двухсуточную бактериальную культуру 3 раза отмывали центрифугированием в физиологическом растворе.

5 г бактериальной массы иерсиний суспензировали в 40 мл физиологического раствора (ФР). Обработывали ультразвуком на дезинтеграторе при 22 кГц 8 раз по 60 секунд, и охлаждали между обработками по 90 секунд в ледяной бане. Разрушенную бактериальную массу освобождали

от целых клеток центрифугированием при 5 тыс. об./мин (8000 g) в течение 20 минут. Надосадочную взвесь повторно центрифугировали при 14 тыс. об./мин. (25000 g) 20 минут. Цитоплазму и периплазму вместе с надосадочной жидкостью удаляли.

1 г полученных клеточных стенок суспензировали в 10 мл 2%-го раствора SDS на дистиллированной воде, инкубировали 20 часов при комнатной температуре с непрерывным перемешиванием. Не экстрагируемые компоненты из раствора удаляли центрифугированием при 14 тыс. об./мин. (25000 g) в течение 20 минут. Освобождение ДМ от SDS проводили диализом в течение 3 суток в дистиллированной воде с девятикратной её сменой и постоянным перемешиванием. Полученные ДМ лиофильно высушивали.

*Изучение химической структуры ДМ *Y. pseudotuberculosis* и  
антигенной активности белков*

Количество белков измеряли по методу М.М. Bradford, 1976 [122], углеводы определяли фенольным методом [130] в обоих методах использовали спектрофотометр с длинами волн, соответственно 750 нм и 490 нм.

Состав белковых фракций исследовался методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS по U.K. Laemmli, 1970 [166] в 12% разделительном геле. Для обнаружения белков после электрофореза использовалась окраска Кумасси синим R-250 (Merck, Германия).

Иммуноблоттинг осуществлялся по методу H. Towbin et al., 1979 [206] с использованием сыворотки, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis* в разведении 1:200, а также конъюгата – антикроличьих антител, меченных пероксидазой (ИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи РАМН).

Электрофорез и иммуноблоттинг ДМ *Y. pseudotuberculosis* были проведены в лаборатории холерных вакцин ФКУН РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора ведущим научным сотрудником, к. м. н. Киреевым М.Н. и любезно предоставлены нам.

### *Получение "ацетонового порошка" *Y. pseudotuberculosis**

Для этого отмытые бактериальные клетки заливали ацетоном в соотношении 1:3, инкубировали на шейкере при 37 °С 1,5 часа, осаждали центрифугированием и удаляли ацетон. Заливку ацетоном, инкубацию, центрифугирование и удаление ацетона повторяли двукратно. Обработанную ацетоном бактериальную массу оставляли при комнатной температуре с доступом воздуха до полного высушивания. Затем измельчали в ступке до получения порошка. "Ацетоновый порошок" использовали для получения ЛПС.

### *Получение ЛПС *Y. pseudotuberculosis**

"Ацетоновый порошок" нагревали в водно-фенольной смеси с 45%-й концентрацией фенола при 65-68 °С 40 минут без разделения слоёв. Последующее удаление фенола проводили диализом через мембрану с размером пор 12-14 кДа в течение 6 суток против проточной воды. Упаривание освобожденной от фенола смеси осуществляли на роторном испарителе до 4-х кратного уменьшения объёма. После этого смесь охлаждали. Белковые примеси осаждали при помощи 40-50%-го раствора трихлоруксусной кислотой, которую добавляли по каплям при постоянном перемешивании и снижении рН с 7,3 до 2,6. Отделение осажденных белков проводили при помощи центрифугирования при 3700 g в течении 30 минут при 5 °С. После центрифугирования трихлоруксусную кислоту из надосадочной жидкости удаляли диализом против дистиллированной воды до установления рН 5,5-6,0. Содержащую ЛПС жидкость лиофилизировали [98].

### *Постановка качественной реакции на присутствие ЛПС*

Качественная реакция на ЛПС заключается в определении КДО реакцией с тиобарбитуровой кислотой. КДО является характерным компонентом ЛПС грамотрицательных бактерий, посредством которого соединяются липидная и полисахаридная части. Определение КДО проводили колориметрическим

методом, описанным в работе [161]. Для этого к 0,25 мл 0,025 н метаиодной кислоты в 0,125 н серной кислоте приливали 0,2 мл водного раствора ЛПС и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Затем при встряхивании добавляли 0,5 мл 2%-го кислого раствора арсенита натрия с 2-х минутной инкубацией и 2 мл 0,3%-го водного раствора тиобарбитуровой кислоты с нагревом в течение 10 минут при 100 °С (кипящая водяная баня). После охлаждения измеряли интенсивность абсорбции при 548 нм. Содержание КДО рассчитывают по калибровочному графику. Для его построения использовали аммонийную соль КДО.

#### *Изучения химической структуры ЛПС *Y. pseudotuberculosis**

Определение моносахаридного состава и состава жирных кислот было проведено в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН (г. Саратов). Полученные результаты были нам любезно предоставлены научным сотрудником, к. б. н. Чернышовой М.П.

Определение состава жирных кислот в виде их метиловых эфиров осуществляли с помощью газожидкостной хроматографии на хроматографе, снабженном капиллярной колонкой HP-5 "Agilent" (США) [171].

Определение моносахаридного состава и установление абсолютных конфигураций сахаров проводили методом газожидкостной хроматографии ацетатов полиолов и ацетилованных октил-гликозидов с оптически активным спиртом (R)-2-октанолом [194, 168].

#### *Определение оптимальной иммунизирующей дозы антигена в опыте на белых мышах*

Для определения оптимальной иммунизирующей дозы вводили внутривенно белым мышам по 0,5 мл антигена в разных дозах. На каждую дозу использовали по 3 мыши. Мышам последней группы инъецировали ФСБ (отрицательный контроль). В качестве антигена использовали ДМ или ЛПС.

Иммунизацию проводили двухкратно с интервалом в 10 суток. Через 10 суток после последней иммунизации мышей декапитировали с взятием крови из шейных сосудов, а также с извлечением перитонеальных макрофагов и замером их дыхательной активности по методу, описанному Т. Mosmann [172] в нашей модификации.

Для извлечения макрофагов в брюшную полость мыши вводили 3 мл 0,01 М ФСБ рН=7,2-7,4 и отбирали из отверстия в брюшине около 2 мл жидкости, содержащей макрофаги. Извлечённые макрофаги отмывали двукратно 0,01 М ФСБ рН=7,2-7,4. Затем осадок растворяли в 1 мл 0,01 М ФСБ рН=7,2-7,4, отбирали 0,1 мл взвеси макрофагов для подсчёта клеток, а 0,9 мл повторно центрифугировали и перерастворяли в 0,9 мл 0,3%-го раствора тетразоля бромида голубого. Инкубировали пробирки на шейкере 1 час при 37 °С. Изменение цвета раствора свидетельствовало об образовании гранул формазана. Центрифугировали содержимое пробирки и ресуспендировали осадок в 0,9 мл диметилсульфоксида с активным покачиванием в течение 5 минут для выхода гранул формазана из перитонеальных клеток. Концентрацию формазана в пробах измеряли на спектрофотометре при длине волны 570 нм. Подсчёт количества перитонеальных макрофагов в 0,1 мл отобранной взвеси осуществляли на гематологическом анализаторе. Рассчитывали количество формазана на 1 клетку макрофага. Высокая дыхательная активность макрофага указывала на активность клеточного иммунитета.

Кровь из шейных сосудов отбирали в пробирку с активатором кровяного сгустка. Затем отделяли сыворотку крови, которую хранили в замороженном виде и исследовали методом ИФА.

*Получение гипериммунной сыворотки крови кролика и морской свинки  
к ДМ и ЛПС *Y. pseudotuberculosis**

Гипериммунные сыворотки получали подкожной иммунизацией кроликов и морских свинок вдоль спины в 3-4 точки в объёме 1 мл смеси ДМ



(или ЛПС) и адьюванта в соотношении 1:1. В качестве адьювантов выступали: ПАФ или 1%-ный ПААГ. Было проведено 5-7 иммунизаций с интервалом в 2 недели. Кровь для исследования брали из ушной вены кролика в объёме 5-10 мл перед введением антигена. Морскую свинку обескровливали после 5-й иммунизации тотально.

Пробирку с полученной кровью инкубировали при комнатной температуре в течение часа до полного образования сгустка. Затем сгусток отделяли от стенок пробирки, а сыворотку переносили в другую пробирку и центрифугировали для полного освобождения от эритроцитов. Полученную сыворотку хранили в замороженном состоянии.

#### *Подсчёт количества лейкоцитов в крови иммунизированных кроликов*

Подсчет количества лейкоцитов проводили на гематологическом анализаторе.

Для исследования производили взятие крови из ушной вены иммунизированного кролика в объеме 1 мл в пробирки с антикоагулянтом. Из общего объема каждой пробы отбирали аликвоту в объеме 9,8 мкл, удаляли из неё эритроциты. Затем помещали исследуемый образец в гематологический анализатор. Результаты получали из аппарата в распечатанном виде.

#### *Постановка ИФА для исследования полученных сывороток*

ИФА проводили в непрямом твёрдофазном варианте на 96-луночном полистироловом планшете.

1. Адсорбировали антиген в лунках полистиролового планшета 1 час при 37 °С на шейкере. Объём вносимого раствора антигена составлял 100 мкл.
2. Лунки планшета промывали трёхкратно 0,01 М ФСБ-Т рН=7,2-7,4, подсушивали на фильтровальной бумаге и проводили блокировку незанятых антигеном сайтов поверхности лунок планшета 2% БСА 30 минут при 37 °С на шейкере. В каждую лунку вносили по 200 мкл раствора.

3. Удаляли содержимое лунок и вносили в них по 100 мкл раствора специфической гипериммунной сыворотки. Планшет инкубировали на шейкере в течение 30 минут при 37 °С.
4. Лунки планшета промывали трёхкратно 0,01 М ФСБ-Т рН=7,2-7,4, подсушивали и вносили в них по 100 мкл антикроличьих иммуноглобулинов, меченных пероксидазой хрена. Планшет термостатировали на шейкере в течение 30 минут при 37 °С.
5. Лунки планшета промывали трёхкратно 0,01 М ФСБ-Т рН=7,2-7,4, подсушивали и вносили в лунки по 100 мкл субстратной смеси. В течение 5 минут после начала внесения субстратной смеси наблюдали изменение окраски содержимого лунок.
6. Останавливали реакцию внесением в лунки 100 мкл стоп-раствора и измеряли оптическую плотность содержимого лунок планшета при 490 нм на автоматическом планшетном фотометре.

Ставили три "отрицательных" и один "положительный" контроли.

Положительной считали реакцию в лунках, оптическая плотность в которых превышала оптическую плотность отрицательных контролей в 2 раза и более.

#### *Постановка ИФА для индикации антигена*

ИФА проводили в непрямом твёрдофазном варианте на 96-луночном полистироловом планшете.

1. На поверхности лунок адсорбировали экспериментальную диагностическую псевдотуберкулёзную сыворотку крови морской свинки в разведении 1:200.
2. Не занятые антителами участки поверхности лунки покрывали БСА.
3. В лунки вносили различные разведения исследуемого антигена.
4. На соединившийся с антителами морской свинки антиген адсорбировали экспериментальную диагностическую псевдотуберкулёзную кроличью сыворотку крови в разведении 1:200.

5. Кроличьи антитела выявляли последовательным добавлением в лунки планшета антикроличьего пероксидазного конъюгата, субстрата и стоп-раствора. Оценку реакции проводили аналогично описанной выше методики ИФА.

#### *Получение конъюгатов ЗНЧ с белком А стафилококка*

ЗНЧ получали по методу G. Frens [150], восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. К 242,5 мл 0,01%-го нагретого водного раствора золотохлористоводородной кислоты добавляли 7,5 мл 1%-го водного раствора цитрата натрия. Реакцию проводили в колбе Эрленмейера с перемешиванием содержимого и с обратным водяным холодильником. Размер частиц контролировали по спектрофотометрической калибровке и методом просвечивающей электронной микроскопии. Средний диаметр полученных частиц составлял 15,2 нм, концентрация частиц –  $1,6 \times 10^{12}$  в 1 мл раствора.

Конъюгацию белка А стафилококка с ЗНЧ проводили методом простой физической адсорбции [24].

Изготовленный конъюгат был любезно предоставлен ведущим научным сотрудником лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН (г. Саратов), д. б. н. Дыкманом Л.А.

#### *Постановка ДИА с конъюгатом ЗНЧ*

ДИА проводили с конъюгатом ЗНЧ и белка А стафилококка.

1. Наносили антиген в объёме 4 мкл в центр квадрата площадью 5×5 мм на нитроцеллюлозной мембране с диаметром пор 0,2 мкм. Подсушивали мембрану при 37 °С в течение 45 минут.

2. Блокировали свободные участки на мембране 2%-м БСА 45 минут при 37 °С на шейкере. Промывали мембрану в 0,01 М ФСБ-Т рН=7,2-7,4.

3. Инкубировали мембрану в пакете из пленки "Parafilm M" с раствором специфической гипериммунной сыворотки в течение 45 минут при 37 °С на шейкере. Промывали мембрану в 0,01 М ФСБ-Т рН=7,2-7,4.

4. Помещали мембрану в пакет с раствором белка А стафилококка, конъюгированного с ЗНЧ. Инкубацию проводили 6 часов при комнатной температуре. Промывали мембрану в 0,01 М ФСБ-Т рН=7,2-7,4.

5. Наличие красных пятен оценивали визуально после извлечения мембраны из мешочка и промывки в 0,01 М ФБР-Т с рН 7,2-7,4.

Ставили контроли: три "отрицательных" и один "положительный".

*Индикация *Y. pseudotuberculosis* в искусственно обсеменённых фекалиями свиней средах накопления на 3 и 6 сутки "холодового обогащения"*

Отобранные в момент дефекации свиней фекалии смешивали с ФСБ рН=7,6-7,8 1:10 и обсеменяли двухсуточными агаровыми культурами кишечной иерсиниозной и псевдотуберкулёзной микробов из расчёта получения микробной взвеси с содержанием  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^2$ , 50 м.к./мл. По 0,5 мл полученных взвесей высевалось в пробирки с 4,5 мл сред накопления: ФСБ рН=7,6-7,8 и 1% ЗПВ. После этого концентрация иерсиний в средах накопления составляла  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^3$ , 50, 5 м.к./мл. Среды накопления с посевами инкубировали при 4 °С 6 суток. Исследование сред в ИФА и ДИА с ЗНЧ проводили на 3-и и 6-е сутки "холодового обогащения" посевов.

Для индикации иерсиний часть содержимого пробирки после перемешивания среды вносили в лунку планшета и обрабатывали 1%-м формалином в течение 4-х часов.

При постановке ИФА титровали 100 мкл среды с фекалиями в ряду лунок двукратно в ФСБ рН=7,2-7,4. ИФА проводили по описанной на стр. 50-51.

ДИА с ЗНЧ проводили с цельной средой и её десятикратным разведением. Техника проведения ДИА описана на стр. 51-52.

Количество иерсиний на жидких средах с фекалиями контролировали высевом на чашки Петри со средой Эндо перед началом обогащения, а также на 3-е и 6-е сутки после начала "холодового обогащения". У микробных колоний изучали визуально культуральные свойства и осуществляли микроскопию с окраской по методу Грама.

#### *Оценка достоверности результатов*

Для оценки достоверности полученных результатов применяли программы Statistica 6 (Statsoft Incorporated) и Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation).

## 2.2. Результаты исследований и их обсуждение

### 2.2.1. Изучение белков, входящих в состав ДМ *Y. pseudotuberculosis*

ДМ получали из штамма *Y. pseudotuberculosis* III O:3 сероварианта (ГКПМ ФКУН РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора) с характерными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

Так как антигенная активность препарата во многом зависит от его химического состава, на первом этапе исследования определили соотношение белков и углеводов в ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Количество белка составляло 720-780 мг на 1 г лиофилизированного препарата ДМ, а количество углеводов – 80-120 мг. Таким образом, соотношение белков и углеводов составило 7,5:1, что свидетельствует о явном преобладании белков. Поэтому нашей первой задачей явилось изучение белкового состава препарата ДМ *Y. pseudotuberculosis*.

Для определения спектра белков, входящих в состав ДМ *Y. pseudotuberculosis* (ДМ *Y. p.*), нами был проведён электрофорез препарата ДМ и лизата цельных клеток псевдотуберкулёзного микроба (ЦК *Y. p.*).

Как видно из рисунка 1а, бактериальная клетка имеет широкий спектр белков, однако в препарат ДМ входят только некоторые из них. В составе ДМ *Y. pseudotuberculosis* преобладают белки с молекулярными массами: 23, 38 и 45 кДа. Из которых в большем количестве содержится белок 38 кДа. Однако наличие данных белков не исключает присутствия в препарате и других белков в более низких количествах.

Полученные нами данные по массе белков несколько отличаются от результатов, приведённых в диссертационной работе С.В. Иващенко [27]. В последней указаны белки с массами 18 и 31 кДа. Однако, по нашему мнению, в исследованиях С.В. Иващенко массы белков не могли быть определены точно, т. к. им использовались всего 2 метчика 67 и 45 кДа.

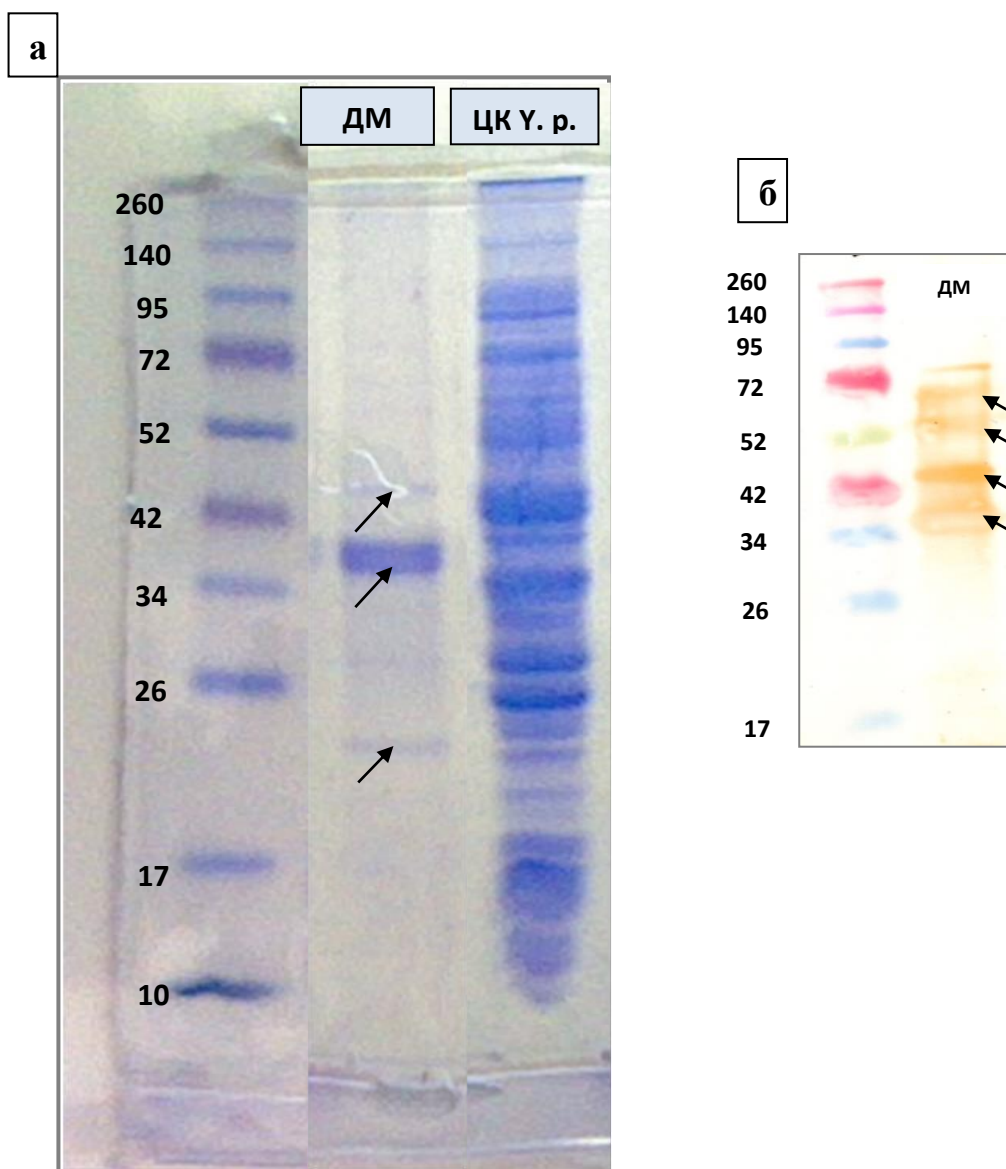


Рисунок 1 – Изучение белкового состава ДМ *Y. pseudotuberculosis*:

а – электрофорез белков;

б – иммуноблотинг с сывороткой, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*

Определение антигенной активности белков ДМ *Y. pseudotuberculosis* нами было проведено на белых мышах. После двукратной внутрибрюшинной иммунизации у мышей были изучены клеточная и гуморальная подсистемы иммунитета. Для изучения клеточного иммунного ответа мы определяли дыхательную активность перитонеальных макрофагов. Изучение гуморального иммунного ответа проводили наблюдением роста титров специфических антител в крови животных. Иммунизация мышей проводилась несколькими

дозами ДМ *Y. pseudotuberculosis* с целью определения количества препарата, необходимого для оптимальной стимуляции иммунной системы животных (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты изучения иммунного ответа мышей после иммунизации их ДМ *Y. pseudotuberculosis*

Дозы ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i> мкг/мышь	Дыхательная активность перитонеальных макрофагов Концентрация формазана на 1 макрофаг для n = 3, г	Титры антител в ИФА с ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i> / двоичные логарифмы титров антител для n = 3	
		титр	логарифм
500	$12,2 \pm 3,49 * 10^{-10}$	1:12800	$13,64 \pm 0,58$
250	$11,6 \pm 1,37 * 10^{-10}$	1:12800	$13,64 \pm 0,58$
125	$10,4 \pm 2,32 * 10^{-10}$	1:6400	$12,97 \pm 0,33$
63	$8,7 \pm 1,53 * 10^{-10}$	1:6400	$12,64 \pm 0,58$
31	$5,8 \pm 1,48 * 10^{-10}$	1:3200	$11,31 \pm 0,33$
16	$3,0 \pm 0,65 * 10^{-10}$	1:1600	10,64
0 (контроль)	$1,6 \pm 0,41 * 10^{-10}$	1:400	$8,97 \pm 0,33$

Полученные данные свидетельствуют о значительной стимуляции клеточного и гуморального иммунного ответа ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Наибольший прирост дыхательной активности макрофагов и величины титров специфических антител наблюдается при иммунизирующих дозах 16-63 мкг/мышь, что позволяет в качестве иммунизирующей выбрать дозу 63 мкг/мышь. Используя методику пересчёта, можно установить, что иммунизирующая доза для кролика массой 2,5 кг составит 2 мг [19].

Для определения масс наиболее активных в антигенном плане белков нами был проведён иммуноблоттинг, результаты которого представлены на рисунке 1б. Для проведения иммуноблоттинга были использованы сыворотки крови кроликов, иммунизированных ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Как видно из



рисунка, сыворотка, полученная к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, взаимодействовала в иммуноблоттинге с белками 38, 45, 58, 66 кДа, входящими в состав ДМ *Y. pseudotuberculosis*, и данные белки имеют наибольшее значение для образования антител в составе ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Однако наиболее интенсивное взаимодействие отмечается с белком молекулярной массы 45 кДа.

Таким образом, из результатов, приведённых в данном разделе, можно сделать следующие выводы:

1. В составе ДМ *Y. pseudotuberculosis* преобладают белки с молекулярными массами: 23, 38 и 45 кДа.

2. Белки ДМ *Y. pseudotuberculosis* способствуют значительной активизации клеточного и гуморального иммунного ответа.

3. Наибольшее значение для образования антител в составе ДМ *Y. pseudotuberculosis* имеют белки с молекулярными массами: 38, 45, 58, 66 кДа.

### **2.2.2. Специфическая активность ДМ *Y. pseudotuberculosis* и гипериммунных сывороток крови, полученных в результате иммунизации кроликов данным антигеном**

Дальнейший этап исследований предполагает исследование специфичности ДМ *Y. pseudotuberculosis* и антител, полученных в результате иммунизации животных данным антигеном.

В таблице 2 представлены результаты изучения антигенной активности ДМ псевдотуберкулёзного микроба. Антигены в концентрации 20 мкг/мл изучали в ИФА с коммерческими диагностическими сыворотками.

Как видно из результатов, представленных в таблице 2, ДМ *Y. pseudotuberculosis* имеет высокую антигенную активность, которая проявляется в реакциях с псевдотуберкулёзной и кишечной синеозными коммерческими сыворотками, т. е. отмечается родовая специфичность у данного антигена. Однако величина титров при взаимодействии ДМ с коммерческими сыворотками из наборов для РНГА несколько различалась, что свидетельствует о присутствии в ДМ некоторого количества видовых

антигенов. Особенно ярко присутствие видовых антигенов проявляется при создании эритроцитарного антигенного псевдотуберкулёзного диагностикума. Это, по-видимому, связано с особенностями сенсibilизации танизированных эритроцитов, препаратом ДМ [27].

Таблица 2 – Антигенная активность ДМ *Y. pseudotuberculosis*

Диагностические сыворотки		Титры антител в ИФА с ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i> / двоичные логарифмы титров антител для n = 5	
		титр	логарифм
Псевдотуберкулёзная для РНГА		1:12800	13,84±0,20
Кишечноиерсиниозная O:3 для РНГА		1:6400	12,64±0,32
Кишечноиерсиниозная O:9 для РНГА		1:6400	12,24±0,25
Псевдотуберкулёзные для ОРА	O:1	1:50	5,84±0,20
	O:3	1:100	6,24±0,25
Кишечноиерсиниозные для ОРА	O:3	1:200	7,64±0,32
	O:9	1:200	7,44±0,20
Эшерихиозные	ОКА	1:400	8,24±0,25
	ОКВ	1:200	7,44±0,20
	ОКС	–	–
	ОКD	–	–
	ОКЕ	1:200	7,64±0,44
Сальмонеллёзная ABCDE		–	–

Примечание – "–" – отрицательный результат.

Относительно высокие титры при взаимодействии ДМ с коммерческими кишечной иерсиниозными сыворотками для ОРА объясняются изначально более высокой активностью данных сывороток в сравнении с аналогичными псевдотуберкулёзными сыворотками. Величина неспецифических реакций ДМ с эшерихиозными и сальмонеллёзной сыворотками незначительна.

В целом специфическая антигенная активность ДМ *Y. pseudotuberculosis* высока, что позволяет рекомендовать данный антиген для иммунизации кроликов.

Для получения специфических антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis* нами была проведена гипериммунизация им кроликов, т. к. известно, что процесс подавляющего преобладания в крови высокоспецифичных иммуноглобулинов класса G завершается после 4-й иммунизации животного. Пятикратную иммунизацию кроликов проводили подкожным введением 2 мг антигена в сочетании с ПАФ.

Сыворотка, полученная к ДМ псевдотуберкулёзного микроба, взаимодействовала в высоких титрах только с клетками *Y. pseudotuberculosis*. Полученная гипериммунная сыворотка крови взаимодействовала в ИФА с цельными клетками *Y. pseudotuberculosis* в титрах 1:12800-1:25600, с клетками *Y. enterocolitica* – 1:200, с клетками бактерий других видов – 1:100-1:400 (Таблица 3). Это свидетельствует о том, что наибольшую активность в выработке антител проявляют белки ДМ *Y. pseudotuberculosis* с видовой специфичностью. Низкие титры антител с клетками бактерий других родов кишечной микрофлоры позволяют использовать полученную сыворотку для индикации иерсиний.

Таблица 3 – Антительная активность гипериммунной сыворотки, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*

Использованные антигены		Титры антител полученной гипериммунной сыворотки в ИФА / двоичные логарифмы титров антител для n = 5	
		титр	логарифм
ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i>		1:409600	18,64±0,32
ДМ <i>Y. enterocolitica</i>		1:51200	15,24±0,25
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i>	О:1 сероварианта	1:25600	14,44±0,20
	О:3 сероварианта	1:25600	14,84±0,20
	О:4 сероварианта	1:12800	13,64±0,32
	О:5 сероварианта	1:25600	14,64±0,55
Клетки <i>Y. enterocolitica</i>	О:3 сероварианта	1:200	7,04±0,25
	О:9 сероварианта	1:200	7,04±0,40
<i>Escherichia coli</i>		1:400	8,24±0,25
<i>Salmonella typhimurium</i>		1:100	6,64±0,32
<i>Proteus vulgaris</i>		1:400	8,44±0,37
<i>Enterobacter aerogenes</i>		1:200	7,24±0,25

Обобщая вышеизложенное в этом разделе, можно сделать следующее заключение.

1. ДМ *Y. pseudotuberculosis* содержит родовые и видовые антигены. Однако антителогенными свойствами обладают в основном белки с видовой специфичностью.

2. Полученная в процессе гипериммунизации кроликов ДМ *Y. pseudotuberculosis* сыворотка крови имела высокие титры антител к псевдотуберкулёзным клеткам и низкие титры антител с клетками бактерий

других родов кишечной микрофлоры, что позволяет её использовать для индикации иерсиний.

### **2.2.3. Получение ЛПС *Y. pseudotuberculosis* и определение его иммунизирующей дозы на белых мышах**

ЛПС присутствует как составная часть в ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Его высокая специфичность и относительная лёгкость выделения из клеточной стенки бактерий послужили причиной рассматривать его как альтернативный антиген для создания тест-системы с более высокой видовой специфичностью.

Для получения ЛПС использовали микробную культуру *Y. pseudotuberculosis* III О:3 сероварианта, обладающую характерными морфологическими, культуральными, биохимическими и серологическими свойствами. После лиофилизации получили 308 мг ЛПС из 10 г "ацетонового порошка". Получение ЛПС проводили методом, исключаящим наличие в препарате белков.

Для более полной характеристики ЛПС псевдотуберкулёзного микроба определяли в нём количество КДО, моносахаридный состав и состав жирных кислот. Данные опыты были проведены в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН (г. Саратов). Полученные результаты были нам любезно предоставлены научным сотрудником, к. б. н. Чернышовой М.П.

Установили, что в нашем образце ЛПС *Y. pseudotuberculosis* содержится 1% КДО. Наличие КДО является качественной реакцией на присутствие в образце ЛПС.

Результаты изучения моносахаридного состава представлены на рисунке 2. Из хроматограммы нами были определены моносахариды-мажоры: рибоза/рамноза, арабиноза/фукоза, ксилоза, манноза, глюкоза, галактоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин.

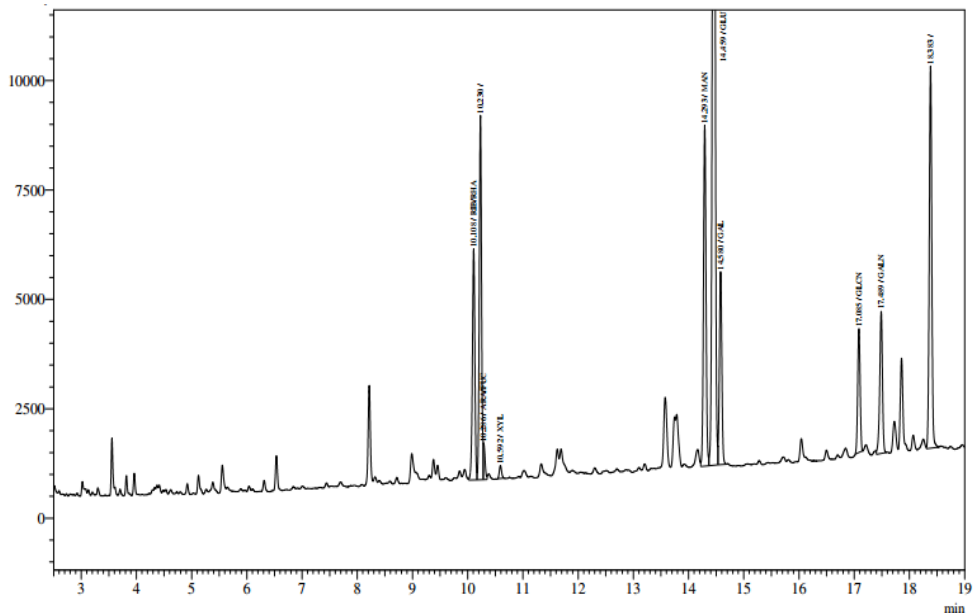


Рисунок 2 – Хроматограмма моносахаридного состава ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

На рисунке 3 представлена хроматограмма с результатами изучения состава жирных кислот. Установлено, что мажорами жирных кислот в полученном образце ЛПС являются: 3-гидрокситетрадекановая, цис-9-гексадекановая, гексадекановая, цис-9,10-метиленгексадекановая кислоты.

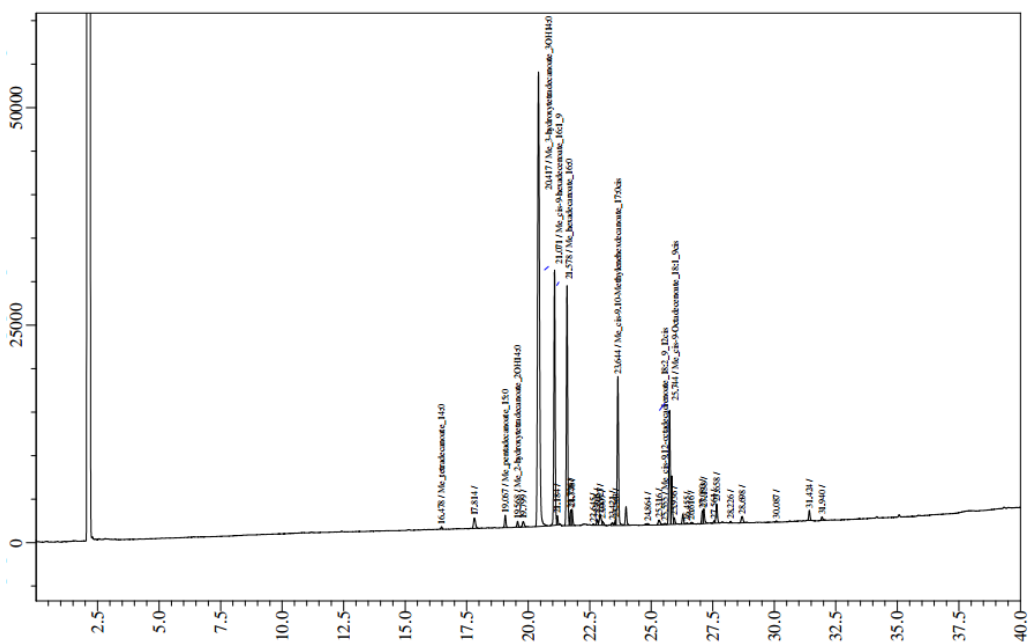


Рисунок 3 – Хроматограмма состава жирных кислот ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

Анализируя графики полученных хроматограмм, можно сделать вывод, что моносахаридный состав и состав жирных кислот исследуемого образца соответствуют составу ЛПС, полученному из бактерий *Y. pseudotuberculosis* в S-форме. Данная информация подтверждается литературными источниками [14, 123].

Токсичность ЛПС псевдотуберкулёзного микроба для многих грызунов, в т. ч. для кроликов, требует тщательного подбора иммунизирующей дозы. При этом ориентироваться только на литературные данные не допустимо, т. к. токсичность зависит не только от вида бактерии, но и от конкретного штамма псевдотуберкулёзного микроба.

Для изучения влияния различных доз ЛПС на активность клеточной и гуморальной подсистем иммунитета вводили внутрибрюшинно белым мышам раствор ЛПС в различных дозах.

Состояние клеточного иммунитета определяли по дыхательной активности перитонеальных макрофагов. Высокая дыхательная активность макрофага указывала на стимуляцию клеточного иммунитета. Величина дыхательной активности находится в прямой зависимости от концентрации формазана, образованного макрофагами.

Гуморальный иммунитет изучали в ИФА с ДМ *Y. pseudotuberculosis* по количеству специфических антител.

Результаты исследований мышей приведены в таблице 4.

Наибольшая дыхательная активность отмечена у макрофагов при иммунизирующих дозах 8-16 мкг ЛПС на мышь.

Повышенный антителогенез у мышей наблюдался при иммунизирующих дозах ЛПС 8-125 мкг/животное.

Таблица 4 – Результаты иммунизации белых мышей ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

Иммунизирующие дозы ЛПС, мкг/мышь	Реакция иммунной системы мышей		
	Дыхательная активность перитонеальных макрофагов.	Антитела к ЛПС	
		Концентрация формазана на 1 макрофаг для n = 3, г	Титры антител в ИФА с ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i> O:3 / двоичные логарифмы титров антител для n = 3
			титр
125	$1,4 \pm 0,48 * 10^{-10}$	1:3200	11,97 ± 0,33
63	$2,7 \pm 0,27 * 10^{-10}$	1:1600	10,64
31	$16,9 \pm 2,84 * 10^{-10}$	1:1600	10,97 ± 0,33
16	$62,6 \pm 3,38 * 10^{-10}$	1:1600	10,64 ± 0,58
8	$68,5 \pm 4,71 * 10^{-10}$	1:1600	10,31 ± 0,33
4	$19,1 \pm 3,57 * 10^{-10}$	1:800	9,64 ± 0,58
2	$8,4 \pm 1,92 * 10^{-10}$	1:800	9,31 ± 0,33
0 (контрольная)	$1,9 \pm 0,65 * 10^{-10}$	1:400	8,64

Таким образом, с учётом всех проведённых исследований оптимальной иммунизирующей дозой ЛПС *Y. pseudotuberculosis* для мышей явилась доза 8-16 мкг на животное. При пересчёте на кролика массой 2,5 кг эта доза составила 0,25-0,5 мг на животное [19]. Дозы ЛПС *Y. pseudotuberculosis* близкие к этим дозам мы взяли для получения гипериммунных сывороток крови у кроликов.

#### **2.2.4. Использование ПААГ в качестве адъюванта для получения кроличьих гипериммунных сывороток к ДМ *Y. pseudotuberculosis***

Принятие нами решения по использованию ПААГ в качестве адъюванта объясняется простотой химического синтеза данного соединения, растворимостью в воде, безопасностью для животных и способностью



связываться с частицами антигенов, в т. ч. с белками и ЛПС бактерий. Следует отметить, что ПААГ ранее уже использовался как адъювант для вакцинации животных при бруцеллёзе в виде полиэлектrolитной субстанции, состоящей из ПААГ и карбоната кальция [69]. Однако для гипериммунизаций ПААГ не использовался.

Образование антител, вызванных действием ПААГ, сравнивали с аналогичным процессом, протекающим в присутствии ПАФ. Данный адъювант является наиболее эффективным для получения гипериммунных сывороток. По классификации он относится к масляно-корпускулярным адъювантам.

В качестве антигена при иммунизации кроликов использовали препарат ДМ *Y. pseudotuberculosis* III О:3 сероварианта с концентрацией белка 2 мг на животное. В контрольных группах антиген заменяли ФР.

В качестве адъювантов использовали две субстанции: 1) 1%-й раствор ПААГ в ФР; 2) ПАФ.

Всего было иммунизировано 5 групп кроликов:

- 1 группа - ДМ + ПААГ (опытная);
- 2 группа - ДМ + ПАФ (опытная);
- 3 группа - ДМ + ФР (контрольная);
- 4 группа - ФР + ПААГ (контрольная);
- 5 группа - ФР + ПАФ (контрольная).

В каждой группе находилось по 3 животных.

Определяли динамику синтеза антител и специфичность гипериммунных сывороток в ИФА. Количество синтезируемых к ДМ антител определяли после каждой иммунизации, а специфичность сывороток определяли после седьмой иммунизации.

В качестве антигенов для ИФА использовали ДМ *Y. pseudotuberculosis* III в концентрации 20 мкг/мл и формализированные клетки в концентрации 1 млрд. м.к./мл.

Результаты изучения динамики синтеза специфических антител

в сыворотках крови кроликов, иммунизированных ДМ *Y. pseudotuberculosis* представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Антительная активность сывороток крови кроликов, иммунизированных ДМ *Y. pseudotuberculosis* с различными адьювантами

Взятие сыворотки проводилось после следующей иммунизации	Титры антител полученных сывороток в ИФА с ДМ 20 мкг/мл / двоичные логарифмы титров антител для n = 3				
	ДМ+ПААГ	ДМ+ПАФ	ДМ+ФР	ПААГ+ФР	ПАФ+ФР
До иммунизации	1:800/ 9,31±0,33	1:800/ 9,97±0,33	1:800/ 9,31±0,33	1:800/ 9,64	1:800/ 9,97±0,33
1	1:6400/ 12,97±0,33	1:6400/ 12,64±0,58	н.д.	н.д.	н.д.
2	1:25600/ 14,64±0,58	1:51200/ 15,97±0,33	1:12800/ 13,64±0,58	1:1600/ 10,31±0,33	1:1600/ 10,31±0,33
3	1:51200/ 15,97±0,33	1:102400/ 16,31±0,33	н.д.	н.д.	н.д.
4	1:102400/ 16,64	1:204800/ 17,64	1:25600/ 14,31±0,33	1:1600/ 10,64±0,58	1:3200/ 11,31±0,33
5	1:204800/ 17,64	1:204800/ 17,64±0,58	н.д.	н.д.	н.д.
6	1:204800/ 17,97±0,33	1:409600/ 18,31±0,33	1:51200/ 15,97±0,33	1:6400/ 12,64±0,58	1:6400/ 12,64
7	1:409600/ 18,64	1:409600/ 18,97±0,33	н.д.	н.д.	н.д.

Примечание – "н.д." – нет данных.

Из таблицы 5 видно, что при использовании ПААГ после 7 иммунизации титр специфических антител в крови кроликов достиг максимального значения 1:409600. По динамике роста титров антител и их величине ПААГ не значительно уступал ПАФ.

В контрольных группах 4 и 5 титры отмечены очень низкие титры антител, что указывает о стимуляции адьювантами антителогенеза только в сочетании с антигеном (Таблица 5). Также использование для иммунизации

антигена без адьюванта в группе 3 приводило к значительному снижению титра специфических антител (Таблица 5).

Следует отметить, что использование ПАФ, в отличие от ПААГ, приводило к возникновению в подкожной клетчатке иммунизированных кроликов значительного количества болезненных уплотнений (Рисунок 4). Гистологическое исследование уплотнений показало наличие в них незрелых лимфобластных и делящихся клеток, окружённых соединительнотканной капсулой, с мелкими участками кровоизлияний.



Рисунок 4 – Уплотнения подкожной клетчатки в местах введения ПАФ

Результаты изучения специфичности полученных гипериммунных сывороток приведены в таблице 6.

Использование ПААГ и ПАФ приводило к получению гипериммунных сывороток с одинаковой специфичностью. Гипериммунные сыворотки крови характеризовались видовой специфичностью (Таблица 6).

Таблица 6 – Специфичность сывороток крови кроликов, иммунизированных ДМ *Y. pseudotuberculosis* с различными адьювантами

Бактериальные клетки (вид, серовариант)	Титры антител полученных сывороток в ИФА с клетками бактерий в разведении $10^9$ клеток/мл / двоичные логарифмы титров антител для n = 3			
	ДМ + ПААГ		ДМ + ПАФ	
	титр	логарифм	титр	логарифм
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:1	1:51200	15,64±0,58	1:51200	15,97±0,33
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:3	1:25600	14,64±0,58	1:51200	15,97±0,33
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:4	1:25600	14,64±0,58	1:25600	14,97±0,33
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:5	1:25600	14,97±0,33	1:51200	15,64
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	1:200	7,31±0,33	1:200	7,64
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	1:200	7,31±0,33	1:200	7,31±0,33
<i>Escherichia coli</i>	1:400	8,64±0,58	1:400	8,31±0,33
<i>Salmonella typhimurium</i>	1:100	6,97±0,33	1:100	6,64±0,58
<i>Proteus vulgaris</i>	1:400	8,64	1:400	8,31±0,33
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1:200	7,31±0,33	1:200	7,64

Незначительные неспецифичные реакции были отмечены с бактериями из порядка *Enterobacterales* в титрах 1:200-1:400. Однако положительные титры специфических антител *Y. pseudotuberculosis* в 128 раз выше положительных титров антител к другим видам бактерий, что позволяет использовать полученные гипериммунные сыворотки при создании иммуноферментных тест-систем для диагностики псевдотуберкулёза (Таблица 6).

По данному разделу проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

1. Использование 1%-го ПААГ в сочетании с ДМ *Y. pseudotuberculosis* позволило получить гипериммунную сыворотку с высоким содержанием антител.
2. Полученная гипериммунная сыворотка обладала видовой специфичностью.
3. По количеству специфических антител и динамике роста их титров ПААГ не значительно уступал ПАФ.
4. В местах инъекции ПААГ не наблюдались болезненные уплотнения подкожной клетчатки.

#### **2.2.5. Использование ПААГ и ДМ *Y. pseudotuberculosis* для получения гипериммунных сывороток морских свинок**

Для проведения непрямого варианта ИФА, направленного на обнаружение антигена, необходимо применение специфических гипериммунных сывороток от разных видов животных. Поэтому нами, помимо кроличьих диагностических сывороток, были получены также гипериммунные сыворотки крови от морских свинок с использованием ДМ *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ. Иммунизацию проводили 0,6 мг антигена на животное с учётом коэффициента межвидового переноса доз с кролика на морскую свинку [19]. Через 10 дней после 5 иммунизации морских свинок тотально обескровливали.

Полученные сыворотки крови морских свинок были исследованы в ИФА. Они проявили видовую специфичность. Титр антител к псевдотуберкулёзному микробу составил 1:12800-1:25600. Что несколько ниже, чем у аналогичных кроличьих сывороток. Титры антител с бактериями из других родов были низкими и составили 1:100-1:200, что позволяет использовать полученные от морских свинок сыворотки для индикации псевдотуберкулёзного микроба (Таблица 7).

Таблица 7 – Активность гипериммунной сыворотки крови морской свинки, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*

Бактериальные клетки в разведении $10^9$ клеток/мл (вид, серовариант)	Титры антител полученных сывороток в ИФА с клетками бактерий / двоичные логарифмы титров антител для n = 5	
	титр	логарифм
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:1	1:25600	14,64±0,32
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:3	1:25600	14,84±0,20
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:4	1:12800	13,44±0,20
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:5	1:25600	14,84±0,37
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	1:200	7,64±0,32
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	1:200	7,24±0,25
<i>Escherichia coli</i>	1:200	7,84±0,37
<i>Salmonella typhimurium</i>	–	–
<i>Proteus vulgaris</i>	1:200	7,24±0,25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1:100	6,64±0,32

Примечание – "n" – количество морских свинок в группе.

Таким образом, нами были получены гипериммунные псевдотуберкулёзные сыворотки крови морских свинок для создания диагностической иммуноферментной тест-системы.

### **2.2.6. Использование ПААГ в качестве адъюванта для получения гипериммунных сывороток к ЛПС *Y. pseudotuberculosis***

На следующем этапе исследования мы многократно иммунизировали кроликов четырьмя дозами ЛПС *Y. pseudotuberculosis* (0,12; 0,25; 0,5; 1 мг/животное) для получения гипериммунных сывороток. Выбор доз обусловлен результатами опыта, описанного в разделе 2.2.3, где косвенным методом было установлено, что оптимальной иммунизирующей дозой ЛПС

*Y. pseudotuberculosis* для кроликов по реакции клеточного иммунитета является доза 0,25-0,50 мг на животное, а при реакции гуморального иммунитета – 0,25-3,9 мг на животное.

Из кроликов сформировали 12 групп:

1, 2, 3, 4 группы иммунизировались четырьмя дозами ЛПС;

5, 6, 7, 8 группы – четырьмя дозами ЛПС в сочетании с ПАФ;

9, 10, 11, 12 группы – четырьмя дозами ЛПС в сочетании с ПААГ.

В каждой группе находилось по 3 животных.

Определяли динамику синтеза антител и специфичность гипериммунных сывороток в ИФА, а также количество лейкоцитов на гематологическом анализаторе.

Количество синтезируемых к ДМ антител определяли после каждой иммунизации, а специфичность сывороток определяли после пятой иммунизации.

В качестве антигенов для ИФА использовали ДМ *Y. pseudotuberculosis* III в концентрации 20 мкг/мл и формализированные клетки в концентрации 1 млрд. клеток/мл. Использование ДМ вместо ЛПС при изучении полученных сывороток крови связано с плохой адсорбцией последнего на поверхности лунок планшета.

Результаты изучения динамики синтеза специфических антител в сыворотках крови кроликов, иммунизированных ЛПС *Y. pseudotuberculosis* представлены в таблице 8.

Из результатов видно, что при дозе 1 мг без использования адъюванта наступала гибель кроликов после третьей иммунизации. У погибших кроликов отмечали патологоанатомические изменения характерные для поражения ЛПС: умеренная зернистая дистрофия печени и почек, набухшая селезёнка, умеренная гиперемия сосудов внутренних органов, отёк лёгких и гибель от остановки дыхательного центра. Это свидетельствовало о более высокой токсичности ЛПС для кроликов в сравнении с мышами. Использование адъювантов позволяло снизить токсический эффект от ЛПС.

Таблица 8 – Антительная активность сывороток крови кроликов, иммунизированных ЛПС *Y. pseudotuberculosis* с различными адъювантами

Время взятия сыворотки	Титры антител, полученных сывороток, в ИФА с ДМ / двойчные логарифмы титров антител для n = 3										
	ЛПС			ЛПС + ПАФ			ЛПС + ПААГ				
ЛПС / кролика, мг											
	1,0	0,5	0,25	0,12	1,0	0,5	0,25	0,12	1,0	0,5	0,25
До иммуни- зации	1:800/ 9,3±0,3	1:800/ 9,6±0,6	1:800/ 9,3±0,3	1:800/ 9,6	1:800/ 9,9±0,3	1:800/ 9,3±0,3	1:800/ 9,3±0,3	1:800/ 9,6±0,6	1:800/ 9,6	1:800/ 9,3±0,3	1:800/ 9,9±0,3
После 1 иммуни- зации	1:200/ 7,6±0,6	1:800/ 9,6	1:800/ 9,9±0,3	1:800/ 9,3±0,3	1:400/ 8,9±0,3	1:800/ 9,6±0,6	1:1600/ 10,3±0,3	1:800/ 9,9±0,3	1:800/ 9,3±0,3	1:800/ 9,9±0,3	1:800/ 9,9±0,3
После 2 иммуни- зации	1:200/ 7,3±0,3	1:800/ 9,3±0,3	1:1600/ 10,3±0,3	1:800/ 9,6±0,6	1:400/ 8,6	1:800/ 9,9±0,3	1:1600/ 10,3±0,3	1:800/ 9,9±0,3	1:1600/ 10,3±0,3	1:1600/ 10,3±0,3	1:1600/ 10,6±0,6
После 3 иммуни- зации	погиб	1:800/ 9,3±0,3	1:1600/ 10,6±0,6	1:800/ 9,6±0,6	1:400/ 8,9±0,3	1:1600/ 10,3±0,3	1:3200/ 11,3±0,3	1:1600/ 10,6±0,6	1:1600/ 10,6	1:3200/ 11,3±0,3	1:3200/ 11,3±0,3
После 4 иммуни- зации	погиб	1:800/ 9,6±0,6	1:3200/ 11,3±0,3	1:1600/ 10,6±0,6	1:800/ 9,3±0,3	1:1600/ 10,6±0,6	1:3200/ 11,6	1:1600/ 10,9±0,3	1:1600/ 10,6	1:6400/ 12,3±0,3	1:12800/ 13,3±0,3
После 5 иммуни- зации	погиб	1:800/ 9,3±0,3	1:3200/ 11,6±0,6	1:1600/ 10,9±0,3	1:800/ 9,6	1:1600/ 10,9±0,3	1:3200/ 11,9±0,3	1:1600/ 10,9±0,3	1:1600/ 10,9±0,3	1:6400/ 12,6±0,6	1:12800/ 13,6±0,6



У всех выживших кроликов доза ЛПС 1 мг вызывала появление умеренно угнетённого состояния и снижение аппетита.

Наибольшая величина титров антител наблюдалась при иммунизирующей дозе 0,25 мг/животное. Данная доза была признана оптимальной для иммунизации кроликов. При этом ПААГ значительно увеличивал антителогенез. ПАФ не позволял увеличить количество антител выше контрольного уровня (Таблица 8). Также недостатком ПАФ являлось образование в местах его инъекций у кроликов уплотнений подкожной клетчатки диаметром 1-2 см, состоящих из незрелых лимфобластных и делящихся клеток, окружённых соединительнотканной капсулой и имеющих мелкие участки кровоизлияний. Данные уплотнения затрудняли последующие иммунизации и вызывали болевую реакцию у животных.

Максимальный титр специфических антител к ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, полученных в результате гипериммунизации, составил 1:12800. Такой относительно невысокий титр специфических антител служит препятствием для дальнейшего использования гипериммунной сыворотки при создании псевдотуберкулёзных тест-систем.

У кроликов исследовали количество лейкоцитов до иммунизации и через 12 дней после 3 и 5 иммунизаций (Таблица 9).

Как видно из таблицы 9, на рост количества лейкоцитов влияло увеличение иммунизирующей дозы ЛПС, а также использование ПААГ. ПАФ при использовании в качестве адъюванта снижал зависимость числа лейкоцитов от дозы ЛПС. По всей видимости, лейкоциты активно участвуют в нейтрализации ЛПС и синтезе антител.

Таблица 9 – Количество лейкоцитов в крови кроликов, иммунизированных ЛПС *Y. pseudotuberculosis* с различными адъювантами

Время взятия сыворотки	Количество лейкоцитов ( $10^9$ клеток/литр) при иммунизации кроликов следующими составами для $n = 3$								
	ЛПС (контроль)			ЛПС + ПАФ			ЛПС + ПААГ		
	ЛПС мг/кролика								
	0,5	0,25	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	0,25	0,12
Перед иммунизацией	7,0 $\pm 1,15$	7,2 $\pm 0,5$	7,1 $\pm 0,52$	7,0 $\pm 0,71$	7,3 $\pm 0,46$	7,2 $\pm 0,61$	7,5 $\pm 0,09$	7,3 $\pm 1,52$	7,4 $\pm 0,83$
После 3 иммунизации	10,0 $\pm 0,25$	8,0 $\pm 0,1$	7,8 $\pm 0,64$	9,6 $\pm 1,3$	9,2 $\pm 1,14$	9,0 $\pm 0,25$	12,0 $\pm 1,16$	10,5 $\pm 0,11$	9,6 $\pm 0,47$
После 5 иммунизации	12,1 $\pm 1,28$	9,1 $\pm 0,08$	8,5 $\pm 0,43$	11,7 $\pm 2,59$	10,9 $\pm 0,87$	10,3 $\pm 0,33$	13,1 $\pm 1,94$	12,2 $\pm 0,79$	11,1 $\pm 0,44$

По результатам исследований, полученных в данном разделе диссертации можно сделать ряд выводов.

1. ЛПС *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта в дозе 1 мг/животное вызывает гибель кроликов. Это свидетельствует о его более высокой токсичности для кроликов в сравнении с мышами.

2. Оптимальной иммунизирующей дозой для получения гипериммунной псевдотуберкулёзной сыворотки является доза 0,25 мг ЛПС *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта на кролика.

3. Использование ПААГ в качестве адъюванта при гипериммунизации кроликов позволяет получать антитела к ЛПС псевдотуберкулёзного микроба в титре 1:12800.

4. При иммунизации кроликов ЛПС псевдотуберкулёзного микроба ПААГ проявляет более выраженные адъювантные свойства в сравнении с ПАФ.

5. Использование ПААГ в качестве адъюванта при гипериммунизации кроликов ЛПС *Y. pseudotuberculosis* приводит к росту количества лейкоцитов.

### **2.2.7. Возможность использования антител, полученных к антигенам клеточной стенки *Y. pseudotuberculosis*, в ДИА с ЗНЧ**

В разделах 2.2.4. и 2.2.6. нами описано получение двух гипериммунных сывороток крови кроликов, иммунизированных ДМ *Y. pseudotuberculosis* и ЛПС *Y. pseudotuberculosis*. Сыворотки получали с использованием в качестве адъюванта ПААГ. В данном разделе мы приводим результаты использования экспериментальных сывороток в непрямом ДИА с конъюгатом ЗНЧ. Конъюгат представлял собой белок А стафилококка, адсорбированный на ЗНЧ диаметром 15 мкм.

На первом этапе эксперимента мы определяли антительную активность экспериментальных сывороток в ДИА с растворимыми антигенами: ДМ и ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, наносимыми на мембрану в 4-х концентрациях (0,5; 5; 50; 500 мкг/мл). Мембраны с антигенами погружали в растворы последовательно двукратно разведённых сывороток. В качестве контроля мы брали коммерческую псевдотуберкулёзную сыворотку из набора диагностического для РНГА (Таблица 10).

Как видно из таблицы 10 растворимые антигены в целом хорошо определяются в ДИА с конъюгатом ЗНЧ. Однако экспериментальные сыворотки ведут себя по-разному.

Сыворотка к ЛПС *Y. pseudotuberculosis* имеет недостаточное количество антител для использования её в ДИА. Невысокое количество антител в данной сыворотке связано с отсутствием белков в составе препарата, использованного для иммунизации кроликов.

Сыворотка к ДМ *Y. pseudotuberculosis* имеет высокие титры антител в ДИА с растворимыми антигенами.

Коммерческая сыворотка менее активна в ДИА, чем сыворотки к ДМ.

Таблица 10 – Антительная активность экспериментальных и коммерческой сывороток в ДИА с растворимыми антигенами

Антигены <i>Y. pseudotuberculosis</i> на мембране в концентрации мкг/мл	Сыворотки полученные		
	после иммунизации следующими антигенами <i>Y. pseudotuberculosis</i>		из псевдотуберкулёзного коммерческого набора для РНГА
	ДМ	ЛПС	
ДМ	Титры антител в сыворотке / двоичные логарифмы титров антител для n = 5		
500	1:25600/ 14,24±0,25	1:800/ 9,64±0,45	1:1600/ 10,24±0,25
50	1:6400/ 12,64±0,45	1:200/ 7,64±0,32	1:400/ 8,64±0,32
5	1:800/ 9,84±0,37	–	–
0,5	1:100/ 6,84±0,20	–	–
ЛПС	Титры антител в сыворотке / двоичные логарифмы титров антител для n = 5		
500	1:800/ 9,44±0,37	–	–
50	1:200/ 7,44±0,20	–	–
5	–	–	–
0,5	–	–	–

Примечание – "–" – отрицательный результат.

Далее нами были проведены исследования на возможность индикации в ДИА цельных клеток бактерий (корпускулярных антигенов) при помощи экспериментальной сыворотки, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*. В качестве препарата сравнения также была взята коммерческая псевдотуберкулёзная сыворотка. В опыте были использованы музейные штаммы различных серовариантов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, а

также псевдотуберкулёзный штамм, выделенный от сельскохозяйственных животных, и штаммы бактерий из родственных иерсиниям родов (Таблица 11).

Несмотря на снижение величины титров в сравнении с растворимыми антигенами клетки иерсиний уверенно определяются в ДИА. Титры коммерческой сыворотки при этом намного ниже.

Таблица 11 – Специфичность сывороток в ДИА с цельными клетками бактерий

Бактериальные клетки		Сыворотки полученные			
		после иммунизации ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i>		из псевдотуберкулёзного коммерческого набора для РНГА	
		Титры антител с клетками бактерий в разведении $10^9$ клеток/мл / двоичные логарифмы титров антител для n = 5			
вид, штамм	серова- риант	титр	логарифм	титр	логарифм
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	O:1	1:1600	10,64±0,32	1:100	6,84±0,20
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	O:3	1:3200	11,84±0,20	1:100	6,24±0,25
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV	O:4	1:1600	10,64±0,45	н.д.	н.д.
<i>Y. pseudotuberculosis</i> V	O:5	1:1600	10,24±0,40	н.д.	н.д.
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 67*	O:3	1:3200	11,84±0,20	н.д.	н.д.
<i>Y. enterocolitica</i> 66-82	O:3	–	–	–	–
<i>Y. enterocolitica</i> 383	O:9	–	–	н.д.	н.д.
<i>Escherichia coli</i>		–	–	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i>		–	–	–	–
<i>Proteus vulgaris</i>		–	–	–	–
<i>Enterobacter aerogenes</i>		–	–	–	–
<i>Klebsiella pneumonia</i>		–	–	–	–

Примечание – "–" – отрицательный результат; "н.д." – нет данных;

\* – ранее выделенный штамм.

Сыворотка к ДМ *Y. pseudotuberculosis* подтверждает свою видовую специфичность с музейными штаммами иерсиний, выделенными от людей, а также со штаммом псевдотуберкулёзного микроба, выделенным от сельскохозяйственных животных (*Y. pseudotuberculosis* 67).

Сыворотка к ДМ *Y. pseudotuberculosis* может быть использована в ДИА с ЗНЧ для индикации псевдотуберкулёзного микроба. Такой вывод подтверждается высокими титрами антител данной сыворотки к клеткам *Y. pseudotuberculosis* и низкими титрами к клеткам других представителей кишечной группы бактерий (Таблица 11).

Из результатов, приведённых в данном разделе, можно сделать следующие выводы:

1. Сыворотка к ЛПС *Y. pseudotuberculosis* имеет недостаточное количество антител для использования её в ДИА с ЗНЧ.

2. Сыворотка к ДМ *Y. pseudotuberculosis* имеет высокие титры антител в ДИА с ЗНЧ с растворимыми и корпускулярными антигенами псевдотуберкулёзного микроба.

3. Сыворотка к ДМ *Y. pseudotuberculosis* имеет видовую специфичность и может быть использована в ДИА с ЗНЧ для индикации псевдотуберкулёзного микроба.

4. Коммерческая псевдотуберкулёзная сыворотка менее активна в ДИА с ЗНЧ, чем сыворотка, полученная к ДМ *Y. pseudotuberculosis*.

#### **2.2.8. Создание иммуноферментной тест-системы на основе антител, полученных к ДМ *Y. pseudotuberculosis***

Была создана тест-система для непрямого ИФА на основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*. В тест-системе использовали экспериментальные сыворотки, полученные от кроликов и морских свинок, описанные в разделах 2.2.4. и 2.2.5. Специфическую сыворотку крови морской свинки применяли для адсорбции исследуемого антигена на планшет, а специфическую сыворотку крови кролика – для индикации адсорбированного антигена. Вместе с

экспериментальными сыворотками в тест-системе применяли коммерческий антикроличий пероксидазный конъюгат (производства ООО фирмы "Имтек", г. Москва).

Чувствительность и специфичность созданной тест-системы изучали в реакции с цельными клетками *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. В эксперименте использовали музейные штаммы иерсиний различных серовариантов, полученные из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб", а также штаммы иерсиний, выделенные от молодняка сельскохозяйственных животных. В качестве контролей был проведён ИФА с коммерческими сыворотками, извлечёнными из наборов для РНГА. Результаты испытания представлены в таблице 12.

Высокую чувствительность и видовую специфичность со всеми штаммами псевдотуберкулёзного микроба показала иммуноферментная тест-система, созданная на основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Количество обнаруженных тест-системой микробных клеток составило  $10^6$ - $10^7$  клеток на 1 мл взвеси. Гипериммунная сыворотка крови кролика, используемая в данной тест-системе в 16 раз активнее коммерческой псевдотуберкулёзной сыворотки (Таблица 12). Таким образом, иммуноферментная тест-система, созданная на основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, выбрана нами для дальнейших исследований.

Таблица 12 – Чувствительность и специфичность иммуноферментных тест-систем с цельными клетками иерсиний

Бактериальные клетки		Сыворотки, полученные		
		после иммунизации ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i>	из коммерческих наборов для РНГА	
вид, штамм	серо-вариант		псевдо-туберкулёзного	кишечно-иерсиниозного О:3
		Музейных штаммов		
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	О:1	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	О:3	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV	О:4	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> V	О:5	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	–
<i>Y. enterocolitica</i> 66-82	О:3	–	–	10 <sup>8</sup>
<i>Y. enterocolitica</i> 383	О:9	–	–	–
Ранее выделенных штаммов				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 13	О:3	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 40	О:3	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 67	О:3	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	–
<i>Y. enterocolitica</i> 58	О:3	–	–	10 <sup>8</sup>

Примечание – "–" – отрицательный результат.

На втором этапе испытаний мы определяли возможность применения выбранной тест-системы для индикации возбудителя псевдотуберкулёза в средах накопления на 3 и 6 сутки "холодового обогащения". Использовали две среды накопления: 1% ЗПВ и ФСБ. В среды предварительно вносили различное количество иерсиний: 5×10<sup>5</sup>, 5×10<sup>3</sup>, 50, 5 клеток/мл, а также фекалии свиней.



Диагностическую сыворотку в тест-системе использовали в разведениях 1:200 и 1:1600, чтобы установить влияние концентрации антител на эффективность работы тест-системы. Для оценки прироста числа иерсиний в процессе "холодового обогащения", исследования проводили с двукратными разведениями сред накопления с 1:2 до 1:256. Результаты опыта представлены в таблице 13.

Как видно из таблицы 13, после внесения в среду накопления 5 клеток/мл *Y. pseudotuberculosis* иммуноферментная тест-система выявляет присутствие данных бактерий в 1% ЗПВ уже на 3 день "холодового обогащения", а в ФСБ – на 6 день. Внесение в среды накопления 50 клеток/мл и выше позволяло обнаруживать псевдотуберкулёзный микроб в обеих средах уже на 3 сутки "холодового обогащения". Посторонняя микрофлора, находящаяся в свиных фекалиях, существенного препятствия процессу индикации иерсиний данной тест-системой не оказывает. Об этом свидетельствует отрицательный контроль, проведённый с фекалиями без иерсиний.

Однако в 1% ЗПВ тест-система обнаруживает помимо псевдотуберкулёзного микроба в незначительной степени *Y. enterocolitica* (Таблица 13). По-видимому, в 1% ЗПВ в условиях холодильника кишечной иерсиниозный микроб образует дополнительные антигены, выявляемые тест-системой, т. к. на клетки *Y. enterocolitica*, выращенные на МПА при 26 °С тест-система ранее не реагировала (Таблица 12). Таким образом, в дальнейшем нам придётся отказаться от использования 1% ЗПВ в качестве среды накопления при работе с иммуноферментной тест-системой.

Рабочим разведением диагностических сывороток в тест-системе нами было выбрано 1:200.

Таблица 13 – 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, м.к./мл		Среды накопления							
		1% ЗПВ				ФСБ			
		время обогащения, сутки							
		3		6		3		6	
		разведения псевдотуберкулёзной сыворотки, использованной 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 псевдотуберкулёзной сывороткой							
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	$5 \times 10^5$	1:16	1:4	1:64	1:16	1:8	1:2	1:32	1:8
	$5 \times 10^3$	1:8	1:2	1:32	1:8	1:4	–	1:16	1:4
	50	1:4	–	1:16	1:2	1:2	–	1:8	–
	5	1:2	–	1:8	–	–	–	1:4	–
<i>Y. enterocolitica</i>	$5 \times 10^5$	–	–	1:4	–	–	–	–	–
	$5 \times 10^3$	–	–	1:2	–	–	–	–	–
	50	–	–	–	–	–	–	–	–
	5	–	–	–	–	–	–	–	–
Контроли	без фекалий*	1:32	1:8	1:128	1:32	1:8	1:2	1:32	1:8
	без иерсиний	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание – "–" – отрицательный результат; \* – контроль без фекалий, но с добавлением *Y. pseudotuberculosis* в количестве  $5 \times 10^5$  клеток/мл среды.

Результаты испытания иммуноферментной тест-системы позволяют сделать следующее заключение:

1. Иммуноферментная тест-система, созданная на основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, проявляет видовую специфичность и высокую чувствительность к клеткам *Y. pseudotuberculosis* после их "холодового обогащения".

2. Посторонняя микрофлора не затрудняет индикацию *Y. pseudotuberculosis* в средах накопления.

3. "Холодовое обогащение" псевдотуберкулёзного микроба для последующей его индикации при помощи иммуноферментной тест-системы рекомендуется проводить в ФСБ.

4. Количество псевдотуберкулёзных бактерий, вносимых в ФСБ для уверенной индикации их иммуноферментной тест-системой на 3 сутки "холодового обогащения", составляло 50 м.к./мл.

5. Рабочее разведение диагностических сывороток в иммуноферментной тест-системе составляет 1:200.

### **2.2.9. Создание дот-иммунотест-системы на основе антител, полученных к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, и ЗНЧ**

Результаты исследований, приведённых в разделе 2.2.7, позволяют использовать для создания дот-иммунотест-системы гипериммунную сыворотку, полученную после иммунизации кроликов ДМ *Y. pseudotuberculosis* в сочетании с ПААГ. Созданная нами дот-иммунотест-система в качестве индикатора использует конъюгат белка А стафилококка с ЗНЧ. Чувствительность и специфичность данной тест-системы изучали на цельных клетках энтеропатогенных иерсиний. В качестве контролей в ДИА нами были использованы коммерческие сыворотки из наборов для РНГА. Результаты испытания представлены в таблице 14 и рисунке 5.

Таблица 14 – Чувствительность и специфичность дот-иммунотест-систем с цельными клетками иерсиний

Бактериальные клетки		Сыворотки полученные		
		после иммунизации ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i>	из коммерческих наборов для РНГА	
			псевдо-туберкулёзного	кишечно-иерсиниозного О:3
вид, штамм	серо-вариант	Количество бактерий в 1 мл взвеси, выявляемое сывороткой, разведённой 1:100		
Музейных штаммов				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	О:1	10 <sup>8</sup>	10 <sup>10</sup>	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	О:3	10 <sup>7</sup>	10 <sup>11</sup>	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV	О:4	10 <sup>8</sup>	10 <sup>11</sup>	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> V	О:5	10 <sup>8</sup>	10 <sup>11</sup>	–
<i>Y. enterocolitica</i> 66-82	О:3	–	–	10 <sup>10</sup>
<i>Y. enterocolitica</i> 383	О:9	–	–	–
Ранее выделенных штаммов				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 13	О:3	10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup>	
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 40	О:3	10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup>	
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 67	О:3	10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup>	–
<i>Y. enterocolitica</i> 58	О:3	–	–	10 <sup>10</sup>

Примечание – "–" – отрицательный результат.

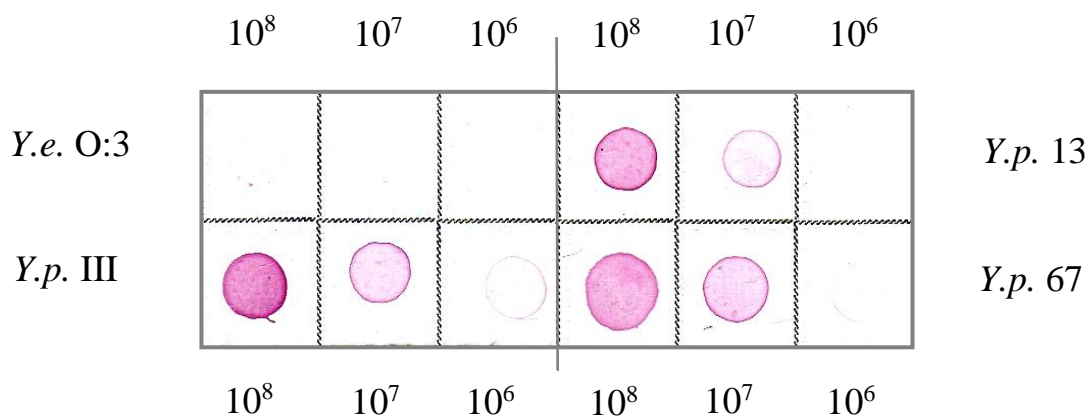


Рисунок 5 – Результаты определения чувствительности и специфичности дот-иммунотест-системы, созданной на основе сыворотки, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*. (*Y.e.* O:3 – клетки *Y. enterocolitica* 66-82; *Y.p.* III, *Y.p.* 13, *Y.p.* 67 – клетки *Y. pseudotuberculosis* III, 13, 67)

Как видно из таблицы 14 наименьшую чувствительность проявили тест-системы, созданные на основе коммерческих сывороток. Количество определяемых ими клеток иерсиний составило  $10^{10}$ - $10^{11}$  в 1 мл. Тест-система, использующая антитела к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, определяла  $10^7$ - $10^8$  м.к./мл. Она в равной степени определяла музейные и ранее выделенные от животных штаммы псевдотуберкулёзного микроба.

Сыворотка, полученная к ДМ *Y. pseudotuberculosis* проявила видовую специфичность к псевдотуберкулёзному микробу, а коммерческие сыворотки – специфичность, заявленную производителем.

На втором этапе исследований экспериментальной дот-иммунотест-системы, её испытали на возможность индикации энтеропатогенных иерсиний в средах накопления после их "холодового обогащения" на 3 и 6 сутки. Использовали две среды накопления: 1% ЗПВ и ФСБ. В среды предварительно вносили различное количество иерсиний:  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^3$ , 50 и 5 клеток/мл, а также фекалии свиней. Результаты опыта представлены в таблице 15 и рисунке 6.

Таблица 15 – Чувствительность экспериментальной дот-иммунотест-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, м.к./мл		Среды накопления			
		1% ЗПВ		ФСБ	
		Время обогащения, сутки			
		3	6	3	6
		Разведения среды, показавшие положительный результат с псевдотуберкулёзной сывороткой (1:100)			
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	$5 \times 10^5$	1:10	1:10	цельная среда	цельная среда
	$5 \times 10^3$	1:10	1:10	цельная среда	цельная среда
	50	цельная среда	1:10	–	цельная среда
	5	цельная среда	1:10	–	–
<i>Y. enterocolitica</i>	$5 \times 10^5$	–	–	–	–
	$5 \times 10^3$	–	–	–	–
	50	–	–	–	–
	5	–	–	–	–
Контроли	без фекалий*	1:10*	1:10**	цельная среда	цельная среда
	без иерсиний	–	–	–	–

Примечание – "–" – отрицательный результат; \* – контроль без фекалий, но с добавлением *Y. pseudotuberculosis* в количестве  $5 \times 10^5$  клеток/мл среды; \*\* – пятна более яркие, чем со сред, содержащих смесь фекалии и иерсиний.

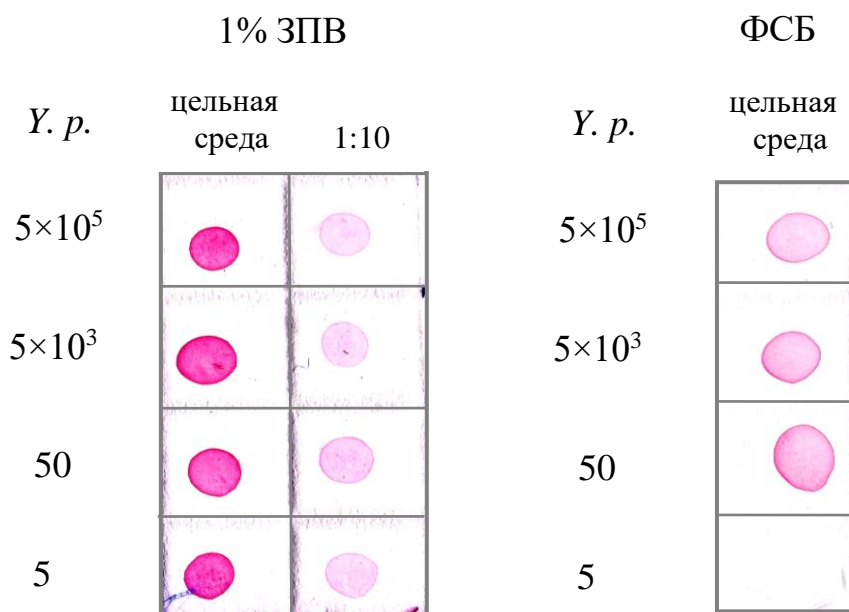


Рисунок 6 – Результаты определения чувствительности экспериментальной системы дот-иммуно-тест-системы со средами накопления на 6-й день их "холодного обогащения" *Y. pseudotuberculosis*

В среде накопления экспериментальная тест-система выявляла совокупность корпускулярных и растворимых антигенов *Y. pseudotuberculosis* уже на 3 сутки "холодового обогащения". Количество псевдотуберкулёзных бактерий, вносимых в среду накопления для уверенной индикации на 3 сутки инкубации, составляло: для 1% ЗПВ – 5 клеток/мл; для ФСБ –  $5 \times 10^3$  клеток/мл. Исходное количество иерсиний в фекалиях инфицированных свиней при этом может составлять  $5 \times 10^2$  и  $5 \times 10^5$  клеток/г соответственно. Наиболее интенсивно процесс накопления протекал в 1% ЗПВ, что связано с её более высокой питательностью по сравнению с ФСБ. Посторонняя микрофлора, находящаяся в свиных фекалиях, не оказывала значительного препятствия процессу индикации иерсиний данной тест-системой (Таблица 15).

По итогам проведённых испытаний созданной дот-иммуно-тест-системы можно сделать следующее заключение:

1. Дот-иммуно-тест-система, созданная на основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis* и конъюгата белка А стафилококка с ЗНЧ, определяла

псевдотуберкулёзный микроб в количестве  $10^7$ - $10^8$  клеток на 1 мл взвеси и выше. Данная тест-система проявила видовую специфичность к *Y. pseudotuberculosis*.

2. Количество псевдотуберкулёзных бактерий, вносимых в 1% ЗПВ для уверенной индикации их дот-иммунотест-системой на 3 сутки "холодового обогащения", составляло в 5 м.к./мл, что соответствует количеству  $5 \times 10^2$  клеток иерсиний на грамм свиных фекалий.

3. ДИА с ЗНЧ показал себя менее чувствительным методом в сравнении с ИФА при индикации псевдотуберкулёзного микроба, однако он не требует наличия специального оборудования для учёта результатов и более доступен для районных ветеринарных лабораторий.

#### **2.2.10. Индикация *Y. pseudotuberculosis* у сельскохозяйственных животных**

Для проведения испытаний созданных тест-систем на сельскохозяйственных животных был осуществлён поиск животноводческих хозяйств с циркуляцией *Y. pseudotuberculosis*. Было исследовано 12 хозяйств в 6 районах левобережной зоны Саратовской области: Балаковского, Ершовского, Краснопартизанского, Марковского, Пугачёвского, Энгельсского. Исследованию подверглись 420 подсвинков в возрасте 2-4 месяцев и 320 телят в возрасте 2-5 месяцев. Молодняк с признаками диареи из общей массы животных не выделялся. Фекалии из прямой кишки помещали в ФСБ и исследовали бактериологическим методом. Исследования проводили в период с октября по май, т.к. в холодное время года высеваемость *Y. pseudotuberculosis* повышается. Результаты исследований представлены в таблице 16 и приложениях В, Г, Д.

Было выделено 11 штаммов *Y. pseudotuberculosis* в 3-х хозяйствах из 3-х районов Саратовской области: Балаковского, Ершовского, Краснопартизанского.

Высеваемость *Y. pseudotuberculosis* от молодняка свиней составила 0,7%, от КРС – 2,5%. В общем количестве исследованных животных высеваемость *Y. pseudotuberculosis* составила 1,5%.



Таблица 16 – Циркуляция *Y. pseudotuberculosis* у сельскохозяйственных животных в некоторых левобережных районах Саратовской области

Дата обследования (месяц, год)	Хозяйство и район области	Количество и вид обследованных животных	Количество выделенных штаммов <i>Y. pseudotuberculosis</i>
1	2	3	4
04.2018	СХА "Урожай", с. Рахмановка Пугачёвский района	60 свиней	–
		40 КРС	–
	ООО "Тритикум", г. Пугачёв Пугачёвского района	40 свиней	–
04.2018	ООО "Липовское", с. Липовка Энгельсского района	40 КРС	–
	ЗАО "Вита-92", с. Красный Яр Энгельсского района	40 КРС	–
04.2018	КФХ "Дукаев З.В.", с. Бородаевка Марксовского района	40 КРС	–
	КФХ "Акумгалиев Ю.У.", с. Каменка Марксовского района	40 КРС	–
11.2018	КФХ "Анохина В.В.", с. Плеханы Балаковского района	80 свиней	–
	КФХ "Гулякин А.В.", г. Балаково Балаковского района	80 свиней	1
04.2019	СПХ "Заря", с. Большая Сакма Краснопартизанского района	80 свиней	2
		40 КРС	4
	КФХ "Мазуркевич Ю.А.", с. Толстовка Краснопартизанского района	80 свиней	–
05.2020	АО "Декабрист", п. Целинный Ершовского района	40 телят	4
	Колхоз "Им. 18-го Партсъезда", с. Новая Краснянка Ершовского района	40 телят	–
Итого:		420 свиней 320 голов КРС	11

Примечание – "–" – *Y. pseudotuberculosis* выделен не был (отрицательный результат).

Количество поражённых животных в неблагополучных хозяйствах не превышает 10%, однако инфекция может распространяться в хозяйстве одновременно на свиней и КРС (Таблица 16).

Штамму псевдотуберкулёзного микроба, выделенному от свиней в Балаковском районе, присвоен номер: Б-С-08, а штаммам из Ершовского района, выделенным от КРС: Е-К-15, Е-К-24, Е-К-28 и Е-К-38. В Краснопартизанском районе получены штаммы с номерами: К-С-69, К-С-73 (от свиней) и К-К-10, К-К-12, К-К-13, К-К-17 (от КРС).

Для определения вирулентности с выделенными культурами псевдотуберкулёзного микроба был поставлен ряд тестов: аутоагглютинация, пигментсорбция, температурозависимость роста колоний. Результаты тестов на вирулентность представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Вирулентность выделенных штаммов *Y. pseudotuberculosis*

Штаммы <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Тесты для определения вирулентности		
	Аутоагглютинация	Пигментсорбция	Температуро- зависимость морфологии колоний
Б-С-08	+	+	+
Е-К-15	+	+	+
Е-К-24	+	+	+
Е-К-28	–	+	+
Е-К-38	–	+	+
К-С-69	–	+	+
К-С-73	+	+	+
К-К-10	+	+	+
К-К-12	+	–	+
К-К-13	+	+	+
К-К-17	+	–	+

Примечание – "+" – положительный результат теста; "–" – отрицательный результат теста.

Серотипирование выделенных штаммов показало, что все они относятся к O:3 сероварианту.

Полученные данные указывают на присутствие у всех выделенных штаммов *Y. pseudotuberculosis* pYV, с которой связано наличие значительной части вирулентных свойств псевдотуберкулёзного микроба (Таблица 17).

### **2.2.11. Испытание созданных тест-систем для индикации**

#### ***Y. pseudotuberculosis* у свиней**

Для проведения испытания созданных тест-систем на сельскохозяйственных животных было выбрано хозяйство СПХ "Заря", с. Большая Сакма, Краснопартизанского района, в котором ранее от свиней и КРС были выделены 6 штаммов вирулентных *Y. pseudotuberculosis*.

В данном животноводческом хозяйстве было обследовано всё поголовье телят в возрасте 2-4 месяцев, т. е. 50 животных.

Пробы фекалий для исследований отбирали в питательную среду накопления (ФСБ), инкубировали в среде при температуре +4 °С с последующим исследованием бактериологическим и серологическим методами на 3 и 6 сутки инкубации.

Бактериологическое исследование осуществлялось высевом микробных культур со сред накопления на чашки со средой Эндо, отбором характерных микробных колоний и идентификацией отобранных бактерий бактериоскопическим и биохимическим методами.

Для проведения серологических исследований из пробирок со средой накопления отбирался небольшой объём микробной культуры, обезвреживался 1%-м формалином в течение 4 часов и подвергался исследованию в ДИА и ИФА с помощью экспериментальных тест-систем. В иммунодот-тест-системе было использовано разведение специфической сыворотки 1:100, а в иммуноферментной системе – 1:200. Результаты исследований представлены в таблице 18 и приложении Е.

Таблица 18 – Результаты бактериологического и серологического исследования сред накопления, содержащих фекалии телят, для индикации в них *Y. pseudotuberculosis* на 3-е и 6-е сутки "холодового обогащения"

№№ проб	Время обогащения, сутки							
	3				6			
	Бактериологическое исследование		Серологическое исследование		Бактериологическое исследование		Серологическое исследование	
	Кол-во отобранных колоний	Выделенный штамм	ДИА	ИФА	Кол-во отобранных колоний	Выделенный штамм	ДИА	ИФА
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0	–	–	0.091*	0	–	–	0.096*
2	3	–	–	0.096	2	–	–	0.100
3	2	–	–	0.090	1	–	–	0.097
4	0	–	–	0.143	1	Y. p.	+	0.267
5	0	–	–	0.082	0	–	–	0.093
6	2	–	–	0.099	1	–	–	0.105
7	0	–	–	0.092	0	–	–	0.098
8	0	–	–	0.098	0	–	–	0.106
9	3	–	–	0.096	2	–	–	0.098
10	0	–	–	0.091	1	–	–	0.095
11	2	Y. p.	+	0.192	3	Y. p.	+	0.280
12	2	–	–	0.090	2	–	–	0.089
13	2	–	–	0.098	1	–	–	0.101
14	0	–	–	0.090	0	–	–	0.089
15	1	–	–	0.092	1	–	–	0.093
16	1	–	–	0.097	1	–	–	0.101
17	0	–	–	0.093	0	–	–	0.098
18	0	–	–	0.091	0	–	–	0.096
19	3	–	–	0.090	1	–	–	0.092
20	1	–	–	0.099	2	–	–	0.114
21	0	–	–	0.084	0	–	–	0.090
22	2	Y. p.	+	0.220	2	Y. p.	+	0.310

1	2	3	4	5	6	7	8	9
23	0	–	–	0.096	0	–	–	0.098
24	1	–	–	0.092	1	–	–	0.098
1	2	3	4	5	6	7	8	9
25	0	–	–	0.086	0	–	–	0.089
26	0	–	–	0.098	0	–	–	0.103
27	3	–	–	0.090	2	–	–	0.091
28	2	–	–	0.101	2	–	–	0.115
29	2	–	–	0.092	1	Y. e.	–	0.113
30	0	–	–	0.084	0	–	–	0.089
31	0	–	–	0.090	0	–	–	0.089
32	0	–	–	0.135	0	–	+	0.250
33	1	–	–	0.090	1	–	–	0.094
34	2	–	–	0.093	2	–	–	0.098
35	0	–	–	0.092	0	–	–	0.095
36	2	–	–	0.089	1	–	–	0.092
37	0	–	–	0.091	0	–	–	0.097
38	0	–	–	0.090	0	–	–	0.093
39	2	–	–	0.088	1	–	–	0.091
40	3	–	–	0.087	2	–	–	0.089
41	0	–	+	0.200	0	–	+	0.285
42	0	–	–	0.093	0	–	–	0.096
43	3	–	–	0.089	2	–	–	0.090
44	0	–	–	0.090	0	–	–	0.094
45	2	–	–	0.097	2	–	–	0.098
46	1	–	–	0.092	1	–	–	0.095
47	1	–	–	0.096	1	–	–	0.099
48	0	–	–	0.090	0	–	–	0.095
49	2	–	–	0.098	2	–	–	0.104
50	0	–	–	0.087	0	–	–	0.092

Примечание: "+" – положительный результат; "-" – отрицательный результат; "\*" – значение оптической плотности; "Y. p." – *Y. pseudotuberculosis*; "Y. e." – *Y. enterocolitica*.

Рассев микроорганизмов на чашки со средой Эндо после 3-х суток "холодового обогащения" позволил отобрать 51 бактериальную колонию сходную по культуральным признакам с *Y. pseudotuberculosis*: с 7 чашек

было отобрано по 1 колонии; с 13 чашек – по 2 колонии; с 6 чашек по – 3 колонии. Чашки, с которых отбор колоний не проводился, либо не имели характерных для *Y. pseudotuberculosis* колоний, либо имели сплошной рост бактериальной флоры, обладающей феноменом "роения". Отбор же нескольких колоний с одной чашки обусловлен незначительными отличиями культуральных признаков у данных колоний, по основной массе критериев, подходящих под описание роста псевдотуберкулёзного микроба. Если в группе колоний, сходных с псевдотуберкулёзными, не имелось внутригрупповых различий, то с чашки отбиралась одна колония. Следует отметить, что большая часть мелких лактоотрицательных колоний, характерных для псевдотуберкулёзного микроба, принадлежала коккам и только 12 колоний грамотрицательным палочкам, что составило 23,5%. По совокупности биохимических признаков было выделено 3 штамма *Y. pseudotuberculosis* и 1 штамм *Y. enterocolitica*.

Все выделения псевдотуберкулёзного микроба подтверждены положительными результатами серологических исследований. Однако экспериментальные тест-системы позволили выявить ещё две положительные пробы (№ 32 и № 41), в которых выделение культуры *Y. pseudotuberculosis* было невозможно по причине сплошного роста посторонней микрофлоры. Однако после повторного взятия фекалий у данных животных, "холодового обогащения" и бактериологического исследования наличие псевдотуберкулёзного микроба у данных животных было подтверждено. Таким образом, эффективность бактериологического метода составила 60%, а серологического – 100%. Обе тест-системы показали сходные результаты индикации.

По данному разделу проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

1. Дот-иммунотест-система и иммуноферментная тест-система, созданные на основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, позволяют определять

в фекалиях телят псевдотуберкулёзный микроб после его "холодового обогащения". Обе тест-системы показали сходные результаты индикации.

2. Все выделения псевдотуберкулёзного микроба подтверждены положительными результатами серологических исследований.

3. Эффективность серологических методов, превысила эффективность бактериологического метода на 40%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первом этапе исследований нами были получены ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Соотношение белков и углеводов в них составило 7,5:1. Молекулярные массы преобладающих белков имели значения: 23, 38 и 45 кДа. ДМ *Y. pseudotuberculosis* способствовали значительной активизации клеточного и гуморального иммунитетов белых мышей. Наибольшее значение для образования антител в составе ДМ *Y. pseudotuberculosis* имели белки с молекулярными массами: 38, 45, 58, 66 кДа. Гипериммунная сыворотка крови кроликов, полученная к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, имела высокие титры антител к псевдотуберкулёзным клеткам и низкие титры антител с клетками бактерий других родов кишечной микрофлоры.

Также нами был выделен ЛПС *Y. pseudotuberculosis*. Оптимальная иммунизирующая доза ЛПС *Y. pseudotuberculosis* для кролика составила 0,25 мг на животное.

Использование ПААГ в качестве адъюванта позволило получить гипериммунные сыворотки крови кроликов и морских свинок с высоким содержанием антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*. По количеству специфических антител и динамике роста их титров ПААГ не значительно уступал ПАФ. В местах инъекции ПААГ не наблюдались болезненные уплотнения подкожной клетчатки. Полученные гипериммунные сыворотки могут быть использованы для создания диагностических псевдотуберкулёзных тест-систем.

Также ПААГ был использован при гипериммунизации кроликов ЛПС *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта. ПААГ проявил более выраженные адъювантные свойства в сравнении с ПАФ и позволил получить антитела к ЛПС в титре 1:12800. Однако данного количества антител недостаточно для создания тест-системы.

На основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis* была создана тест-система для непрямого ИФА. Она проявила видовую специфичность и высокую



чувствительность к клеткам *Y. pseudotuberculosis* после их "холодового обогащения". Количество псевдотуберкулёзных бактерий, вносимых в ФСБ для уверенной индикации их иммуноферментной тест-системой на 3 сутки "холодового обогащения", составляло 50 клеток/мл.

Также на основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis* и конъюгата белка А стафилококка с ЗНЧ, был создана дот-иммунотест-система, которая определяла псевдотуберкулёзный микроб в количестве  $10^7$ - $10^8$  клеток на 1 мл взвеси и выше. Данная тест-система проявила видовую специфичность к *Y. pseudotuberculosis*. Количество псевдотуберкулёзных бактерий, вносимых в 1% ЗПВ для уверенной индикации их дот-иммунотест-системой на 3 сутки "холодового обогащения", составляло в 5 клеток/мл, что соответствует количеству  $5 \times 10^2$  клеток иерсиний на грамм свиных фекалий.

Для проведения испытаний созданных тест-систем на сельскохозяйственных животных был осуществлён поиск животноводческих хозяйств с циркуляцией *Y. pseudotuberculosis*. Было исследовано 12 хозяйств в 6 районах левобережной зоны Саратовской области. Исследованию подверглись 420 подсвинков и 320 телят. Было выделено 11 штаммов *Y. pseudotuberculosis* в 3-х хозяйствах из 3-х районов Саратовской области.

Для проведения испытания созданных тест-систем на сельскохозяйственных животных было выбрано хозяйство, в котором ранее от свиней и КРС были выделены 6 штаммов вирулентных *Y. pseudotuberculosis*. В данном животноводческом хозяйстве было обследовано 50 животных. Дот-иммунотест-система и иммуноферментная тест-система, созданные на основе антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, позволили определить в фекалиях телят псевдотуберкулёзный микроб после его "холодового обогащения". Обе тест-системы показали сходные результаты индикации. Все выделения псевдотуберкулёзного микроба подтверждены положительными результатами серологических исследований. Эффективность серологических методов превысила эффективность бактериологического метода на 40%.

Таким образом, нами созданы две диагностические псевдотуберкулёзные тест-системы: иммуноферментная и её дот-вариант с ЗНЧ. Данные тест-системы позволяют успешно определять *Y. pseudotuberculosis* у сельскохозяйственных животных после "холодового обогащения" их фекалий. Что позволяет значительно повысить эффективность бактериологического метода.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что использование 1%-го раствора полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в сочетании с дезинтегрированными мембранами *Y. pseudotuberculosis* позволяет получать гипериммунные сыворотки крови кроликов и морских свинок с высоким содержанием антител видовой специфичности. Титр антител в ИФА с клетками псевдотуберкулёзного микроба составляет 1:25600-1:51200, а с дезинтегрированными мембранами – 1:409600.

2. Установлено, что использование полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в качестве адъюванта при гипериммунизации кроликов позволяет получать антитела к ЛПС псевдотуберкулёзного микроба в титре 1:12800.

3. Создана экспериментальная иммуноферментная тест-система на основе гипериммунных сывороток, полученных в результате иммунизации кроликов и морских свинок ДМ *Y. pseudotuberculosis* в комплексе с полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода. Созданная иммуноферментная тест-система выявляла клетки *Y. pseudotuberculosis* в концентрации  $10^6$ - $10^7$  м.к./мл.

4. Создан дот-вариант экспериментальной иммуноферментной тест-системы на основе кроличьей гипериммунной сыворотки, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, и ЗНЧ. Созданный дот-вариант тест-системы выявлял клетки *Y. pseudotuberculosis* в концентрации  $10^7$ - $10^8$  м.к./мл и не показывал неспецифических реакций.

5. Установлено, что при индикации *Y. pseudotuberculosis* у телят эффективность созданной иммуноферментной тест-системы и её дот-варианта с ЗНЧ превысила эффективность бактериологического метода диагностики на 40%.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для получения диагностических псевдотуберкулёзных сывороток предлагается совместно использовать ДМ *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ.

2. Предлагается повысить эффективность бактериологического метода диагностики псевдотуберкулёза животных дополнительным исследованием сред накопления при помощи созданной экспериментальной иммуноферментной тест-системы и её дот-варианта с ЗНЧ.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Планируется испытание созданной экспериментальной иммуноферментной тест-системы и её дот-варианта с ЗНЧ на других видах сельскохозяйственных животных. Сконструированные нами видовые тест-системы планируется использовать в комплексе с кишечной иерсиниозными и родовыми иерсиниозными диагностическими препаратами для индикации энтеропатогенных иерсиний у сельскохозяйственных животных.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- БКД – буферно-казеиново-дрожжевая питательная среда
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ДИА – дот-иммуноанализ
- ДМ – дезинтегрированные мембраны
- ДНК – дезоксиуклеиновая кислота
- ЗНЧ – золотые наночастицы
- ЗПВ – забуференная пептонная вода
- ЗФР – забуференный физиологический раствор
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КББ – карбонатно-бикарбонатный буферный раствор
- КДО – кето-3-дезоксиктоновая кислота
- КРС – крупный рогатый скот
- ЛПС – липополисахарид
- м.к./мл – микробных клеток в миллилитре
- м. м. – молекулярная масса
- МПА – мясопептонный агар
- МПБ – мясопептонный бульон
- МР – методические рекомендации
- МУ, МУК – методические указания
- МФА – метод флуоресцирующих антител
- НАФ – неполный адъювант Фрейнда
- ОРА – ориентировочная реакция агглютинации
- ПААГ – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода
- ПАФ – полный адъювант Фрейнда
- ПК – пептонно-калиевая питательная среда
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РА – реакция агглютинации
- РКА – реакция коагглютинации

РЛА – реакция латексной агглютинации

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

СБТС – плотная питательная среда с бромтимоловым синим

ТЛТ – термолабильный токсин

ТСТ – термостабильный токсин

тыс. об./мин. – тысяч оборотов в минуту

ФМЖ – фосфатно-буферный солевой бульон с добавлением 1% маннита и 0,15% желчных солей

ФМП – фосфатно-буферный солевой бульон с маннитом и пептоном

ФР – физиологический раствор

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

ФСБ-Т – фосфатно-солевой буферный раствор с твином-20

ЦК – целые клетки

ЦФБ – цитратно-фосфатный буферный раствор

Ail – белок адгезин

SIN-агар – цефсулодин-иргазанновобиоциновый питательный агар

ЕСА – общий антиген энтеробактерий

g – гравитационная постоянная

IgA, IgG, IgM – иммуноглобулины классов А, G, М

Inv – белок инвазин

ITC – жидкая питательная среда с иргазаном с тикарцилином

pH – водородный показатель

PsaA – антиген pH 6

pYV – плаزمида вирулентности иерсиний

SDS – додецилсульфат натрия

Sys – шапероны, белки-помошники Yops

Yops – эффекторные белки, кодируемые pYV

Ypm – суперантиген иерсиний

Ysc – белки системы секреции III типа, кодируемые pYV

Y. p. – *Yersinia pseudotuberculosis*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абзаева, К. А. Биологически активные производные полиакриловой кислоты / К. А. Абзаева, М. Г. Воронков, В. А. Лопырев // Высокомолекулярные соединения. Серия В. – 1997. – Т. 39, № 11. – С. 1883-1904.
2. Аллергенные свойства конъюгата овальбумина с сополимером акриловой кислоты и N-винилпирролидона / Р. В. Петров, Р. М. Хайтов, И. С. Гуцин [и др.] // Докл. АН СССР. – 1985. – Т. 283, № 6. – С. 1513-1516.
3. Анализ закономерностей состава жирных кислот в различных штаммах энтеропатогенных видов бактерий рода *Yersinia* / Б. Г. Андрюков, Н. Ф. Тимченко, Е. П. Недашковская, Л. И. Соколова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. – Т. 63, № 5. – С. 31-35.
4. Андрюков, Б. Г. Родо- и видоспецифические белки *Yersinia pseudotuberculosis*, их использование для конструирования диагностических препаратов: автореф. дис. канд. мед. наук: 03.00.07, 14.00.36 / Андрюков Борис Георгиевич. – Владивосток, 1999. – 23 с.
5. Антигенные свойства пикратов полиоснований / Р. В. Петров, В. П. Евдаков, Р. М. Хайтов [и др.] // Докл. АН СССР. – 1977. – Т. 236, № 5. – С. 1260-1263.
6. Апробация иммуноферментной тест-системы на основе белка порина из *Yersinia pseudotuberculosis* для диагностики псевдотуберкулеза (экстраинтестинального иерсиниоза) у детей / О. Д. Новикова, О. П. Вострикова, О. Ю. Портнягина [и др.] // Иммунология. – 2000. – № 2. – С. 59-61.
7. Багрянцев, В. Н. Эпидемиологическое значение применения метода иммуноферментного анализа для индикации антигенов псевдотуберкулезного микроба / В. Н. Багрянцев, В. С. Цветков, Ф. Н. Шубин // Иерсиниозы (микробиол., эпидемиол., клин., патогенез,

- иммунол.): Тез. докл. Всесоюзн. науч.-практич. конф. – Владивосток, 1986. – С. 102-104.
8. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний / О. Ю. Портнягина, О. Д. Новикова, О. П. Вострикова [и др.] // Вестник ДВО РАН. – 2004. – № 3. – С. 35-44.
  9. Бахолдина, С. И. Экологические аспекты вирулентности бактерий псевдотуберкулеза / С. И. Бахолдина, Т. Ф. Соловьева // Вестник ДВО РАН. – 2009. – № 3. – С. 85-90.
  10. Безопасность и иммуногенность инактивированной гриппозной вакцины с адьювантом совидон производства ФГУП "НПО "Микроген" Минздравсоцразвития России / А. Н. Никифорова, А. Н. Миронов, Д. С. Бушменков [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – Т. 57, № 2. – С. 30-34.
  11. Вакараева, М. М. Действие полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на условно-патогенные микроорганизмы и образование биопленок: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / Вакараева Малика Мовсаровна. – Оболенск, 2015. – 22 с.
  12. Варбанец, А. Д. Методы исследования эндотоксинов / А. Д. Варбанец, Г. М. Здоровенко, Ю. А. Книрель. – Киев: Наук. думка, 2006. – 238 с.
  13. Веденеева, Н. В. Экотоксикологическая характеристика полиазолидинаммоний ионогидрата и обоснование его использования в комбинированных системах очистки воды: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.08 / Веденеева Наталия Владимировна. – Пенза, 2015. – 23 с.
  14. Видяева, Н. А. Сравнительный анализ липополисахарида штаммов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* различного происхождения / Н. А. Видяева, А. В. Гаева // Пробл. особо опасн. инфекц. – 2007. – Вып. 94. – С. 43-45.



15. Влияние синтетических полиамфолитов на взаимодействие Т- и В-лимфоцитов / В. П. Евдаков, В. А. Кабанов, Е. В. Кожина [и др.] // Докл. АН СССР. – 1975. – Т. 224, № 2. – С. 464-467.
16. Влияние синтетических полиэлектролитов на кооперацию Т- и В-клеток при иммунизации мышей разных генотипов искусственным антигеном (Т, Г)-А-Л / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, А. Ш. Норимов, С. А. Корякин // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1981. – № 5. – С. 590.
17. Влияние сополимеров N-винилпирролидона и акриловой кислоты на отдельные этапы иммуногенеза / А. М. Нажмитдинов, Р. М. Хаитов, А. Ш. Норимов [и др.] // Журн. микробиологии. – 1979. – № 9. – С. 14-18.
18. Влияние структуры на взаимодействие липополисахарида с порином наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* / Т. И. Вакорина, О. Д. Новикова, И. Н. Красикова [и др.] // Электронный журнал "Исследовано в России". – С. 1285-1301.
19. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз / Е. В. Шекунова, М. А. Ковалева, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 19-28.
20. Действие синтетического адьюванта на формирование иммунной реакции / С.В. Савина, В.М. Скорляков, С.В. Иващенко, В.С. Муртаева // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – Т. 50, № 8, ч. 2. – С. 42-44.
21. Заднова, С. П. Механизмы секреции грамотрицательных бактерий / С. П. Заднова, Ю. В. Лозовский // Пробл. особо опасн. инфекц. – 2005. – Вып. 90. – С. 11-16.
22. Замещение функции Т-клеток поли-4-винилпиридином при формировании первичного и вторичного иммунного ответа / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, Е. В. Кожина, В. П. Евдаков // Цитология. – 1975. – Т. 17, № 10. – С. 1172-1176.

23. Захарова, И. Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И. Я. Захарова, Л. В. Косенко. – Киев: Наук. думка, 1982. – 192 с.
24. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / Л. А. Дыкман, В. А. Богатырёв, С. Ю. Щёголев, Н. Г. Хлебцов. – М.: Наука, 2008. – 319 с.
25. Зыкин, Л. Ф. Иерсиниоз и псевдотуберкулез сельскохозяйственных животных / Л. Ф. Зыкин, А. А. Щербаков, З. Ю. Хапцев. – Саратов, 2002. – 67 с.
26. Иващенко, С. В. Выявление возбудителя псевдотуберкулеза у сельскохозяйственных животных в хозяйствах Саратовской области / С. В. Иващенко, А. А. Щербаков // Актуальные вопросы микробиологии и инфекционной патологии животных: Сб. науч. тр. – Омск: ИВМ ОмГАУ, 2004. – С. 56-61.
27. Иващенко, С.В. Выявление циркуляции *Yersinia pseudotuberculosis* среди сельскохозяйственных животных в Саратовской области и создание диагностических препаратов на основе мембранных белков: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.07 / Иващенко Сергей Владимирович. – Саратов, 2000. – 16 с.
28. Иващенко, С. В. Распространение псевдотуберкулёзного микроба среди молодняка сельскохозяйственных животных в Саратовской области / С. В. Иващенко, А. А. Щербаков, В. Г. Ребров // Актуальные проблемы ветеринарной патологии сельскохозяйственных животных и птиц: Материалы Всерос. науч.-практич. конф. – Саратов: Научная книга, 2008. – С. 66-68.
29. Иерсинии и иерсиниозы / Под ред. проф. Г. Я. Ценева. – СПб.: Изд-во ООО "Бастион" – 2006. – 168 с.
30. Иерсиниозы / Н. Д. Ющук, Г. Я. Ценева, Г. Н. Кареткина, Л. Е. Бродов. – М.: Медицина, 2003. – 208 с.
31. Иерсиниозы в Российской Федерации: Информ. бюлл. Вып. 3 / Под ред. А. А. Тотоляна. – СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2022. – 44 с.

32. Изучение иммуногенных и протективных свойств термостабильного летального токсина *Yersinia pseudotuberculosis* и его влияния на гематологические и цитокиновые параметры крови лабораторных мышей / А. В. Цыбульский, Н. Ф. Тимченко, Э. Я. Костецкий, Н. С. Воробьева // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 227-236.
33. Иммуноадьюванты, классификация и их применение в фармацевтическом производстве / Д. В. Васильева, М. С. Григорьева, Е. В. Ворфоломеева [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – Т. 20, № 3. – С. 80-88.
34. Иммуногенность комплекса бычьего сывороточного альбумина с поликатионом, нагруженным гидрофобными боковыми группами / В. А. Кабанов, М. И. Мустафаев, А. Ш. Норимов [и др.] // Докл. АН СССР. – 1978. – Т. 243, № 5. – С. 1130-1133.
35. Иммунология псевдотуберкулёза / Г. П. Сомов, Н. Н. Беседнова, М. Ф. Дзадзиева, Н. Ф. Тимченко. – М.: Изд-во "Наука", 1985. – 183 с.
36. Иммуномодуляторы и специфическая профилактика инфекционных болезней / Н. Д. Омельченко, И. А. Иванова, И. А. Беспалова, А. В. Филиппенко // Пробл. особо опасн. инфекц. – 2017. – Вып. 3. – С. 21-26.
37. Иммунохимическая активность Б-антигена *Yersinia pseudotuberculosis* // А. А. Бывалов, Л. Г. Дудина, А. В. Чернядьев [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. – № 2. – С. 32-38.
38. Использование иммунодот тест-системы для индикации *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* в средах накопления / А. Хаджу, С. В. Иващенко, А. С. Фомин [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 7. – С. 38-42.
39. Использование наночастиц углерода в иммунодиагностике псевдотуберкулёза / Н. Ф. Тимченко, М. Б. Раев, Б. Г. Андрюков [и др.] // Инфекции, обусловленные иерсиниями: материалы III Всерос. науч.-

- практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 106-108.
40. К проблеме надзора за иерсиниозами в условиях субтропиков в Краснодарском крае / Ю. В. Юничева, Г. Д. Брюханова, Л. В. Невенчанная [и др.] // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Матер. II Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2006. – С. 149-151.
41. Карбышева, С. Б. Сравнительная характеристика нюансов бактериологического метода диагностики иерсиний / С. Б. Карбышева, Г. И. Уланова, Л. Ю. Бутакова // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Матер. III Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 67-68.
42. Каськов, Ю. Н. Современное состояние заболеваемости иерсиниозами на объектах железнодорожного транспорта России / Ю. Н. Каськов, Ю. И. Подкорытов, П. В. Кретов // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Матер. III Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 69-71.
43. Комплексы белков с неприродными полиэлектролитами – тимуснезависимые антигены / И. В. Виноградов, В. А. Кабанов, М. И. Мустафаев [и др.] // Докл. АН СССР. – 1982. – Т. 263, № 1. – С. 228-230.
44. Конструирование тест-системы с наночастицами коллоидного серебра для обнаружения возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в дот-иммуноанализе / Т. Ю. Загоскина, М. В. Чеснокова, В. Т. Климов, [и др.] // ЖЭМИ. – 2017. – № 1. – С. 55-61.
45. Концептуальная схема патогенеза псевдотуберкулеза / И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, В. В. Малышев, И. В. Малов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – Т. 45, № 7. – С. 211-220.

46. Королюк, А. М. Реакция непрямой гемагглютинации при псевдотуберкулезе (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадке) / А. М. Королюк // ЖМЭИ. – 1969. – № 1. – С. 121-125.
47. Куляшова, Л. Б. Получение на основе отечественных материалов иммуноферментного конъюгата для выявления псевдотуберкулеза / Л. Б. Куляшова, Н. Г. Рощина, Г. Я. Ценёва // Лаб. дело. – 1988. – № 8. – С. 50-52.
48. Куляшова, Л. Б. Роль антигенов наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* в патогенезе и диагностике псевдотуберкулеза / Л. Б. Куляшова, Г. Я. Ценёва, Ю. Б. Буйневич // ЖМЭИ. – 1997. – № 1. – С. 14-18.
49. Лекции лауреатов Демидовской премии (1993-2004) // От синтетических полиэлектролитов к полимер-субъединичным вакцинам / А. А. Кабанов. – Екатеринбург: изд-во Уральского ун-та, 2006. – С. 412-447.
50. Лусс, Л. В. Роль полиоксидония как иммуномодулятора и иммуноадьюванта при профилактике гриппа / Л. В. Лусс // Медицинский совет. – 2013. – № 8. – С. 50-54.
51. Махнев, М. В. Антропургические очаги псевдотуберкулеза: механизмы формирования в воинских коллективах / М. В. Махнев // Журнал микробиологии. – 2006. – № 2. – С. 11-17.
52. Медуницин Н. В. Вакцинология / Н. В. Медуницин. – М.: Триада-Х", 1999. – 272 с.
53. Методические особенности получения и иммунохимическая характеристика видо и серовароспецифических псевдотуберкулёзных и кишечнойерсиниозных диагностических иммуноглобулинов / З. П. Девдариани, В. А. Фёдорова, Ж. Г. Самелия [и др.] // Инфекции, обусловленные иерсиниями: материалы II Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2006. – С. 64-66.
54. Методические рекомендации "Псевдотуберкулез и иерсиниоз (эпидемиология, клиника, диагностика, терапия)", утверждённые

- Департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 11.05.2004 г. № 11-3/8-09. – Москва, 2004. – 26 с.
55. Механизмы адъювантных эффектов полиоксидония / А. С. Иванова, Н. Г. Пучкова, А. В. Некрасов [и др.] / Иммунология гемопоза. – 2015. – Т. 13, № 2. – С. 30-92.
  56. Мониторинг заболеваемости иерсиниозами и обсемененности окружающей среды этими возбудителями в Тюменской области. Сообщение 2. Эпидемиологическая характеристика вспышек псевдотуберкулеза в Тюменской области / К. Г. Перминова, В. В. Мефодьев, О. А. Дубинина [и др.] // Эпидемиол. и инфек. болезни. – 2014. – № 1. – С. 25-30.
  57. Мороз, С. И. Влияние температуры культивирования *Yersinia pseudotuberculosis* на состав липополисахарида и липополисахарид-белкового комплекса / С. И. Мороз, И. М. Ермак, Т. Ф. Соловьёва // Тез. докл. VIII Всесоюзной конф. "Химия и биохимия углеводов" (Тбилиси, 17-19 ноября 1987 г). – Пушино, 1987. – С. 175-176.
  58. МУ 3.1.1.2438-09. Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Методические указания, утверждённые Роспотребнадзором от 22.01.2009 г. – Москва, 2009. – 46 с.
  59. МУК 4.2.3019-12. Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях. Методические указания, утверждённые Роспотребнадзором от 18.06.2012 г. – Москва, 2012. – 60 с.
  60. Набиева, Ф.С. Значение иммуноферментного анализа в диагностике инфекционных заболеваний в диагностике инфекционных заболеваний / Ф. С. Набиева, Г. А. Душанова, О. О. Бобокулов // Вестник науки и образования. – 2021. – Т. 107, № 4, ч. 1. – С. 54-56.
  61. Никифорова, А. Н. Безопасность и иммуногенность тривалентной инактивированной гриппозной вакцины с новым адъювантом: автореф.

- дис. канд. биол. наук: 03.02.02 / Никифорова Александра Николаевна. – СПб., 2015. – 25 с.
62. Никифорова, А. Н. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адьювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18-60 лет / А. Н. Никифорова, И. Н. Исакова-Сивак, М. К. Ерофеева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 75, № 2. – С. 72-78.
63. Новый принцип создания искусственных иммуногенов / В. А. Кабанов, Р. В. Петров, Р. М. Хаитов [и др.] // ЖВХО им. Д. И. Менделеева. – 1982. – Т. 27, № 4. – С. 417-428.
64. Новый тип углеводсодержащих искусственных антигенов. Синтез и иммунохимические свойства углеводсодержащего сополимера со специфичностью фактора О:3 бактерий *Salmonella* серологической группы Е / Н. А. Кочетков, Б. А. Дмитриев, А. Я. Черняк [и др.] // Докл. АН СССР. – 1982. – Т. 263, № 5. – С. 1277-1280.
65. Оводов, Ю. С. Липополисахариды псевдотуберкулёзного микроба / Ю. С. Оводов, Р. П. Горшкова // Химия природных соединений. – 1988. – № 2. – С. 163-171.
66. Особенности формирования микробных биопленок условно-патогенными штаммами *Escherichia coli* и разработка способов борьбы с ними / О. В. Нечаева, Б. М. Аль-Баяти, Е. В. Глинская [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 776-782.
67. Оценка реактогенных свойств химической полиэлектролитной субстанции – адьюванта в эксперименте / С. В. Савина, В. М. Скорляков, А. А. Частов, С. Ю. Веселовский // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – Т. 59, № 5. – С. 103-106.
68. OmpF порины бактерий рода *Yersinia*: молекулярно-генетические аспекты / А. М. Стенкова, Е. П. Быстрицкая, К. В. Гузев [и др.] // Вестник ДВО РАН. – 2014. – № 1. – С. 142-148.

69. Патент № 2593012 Российская Федерация, МПК А61К39/00 (2006.01). Полимерный адъювант – антиген-носитель для вакцин : № 2015104525/15 : заявл. 10.02.2015 : опубл. 27.07.2016 / Скорляков В. М., Савина С. В., Заярский Д. А., Трубкина М. В. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова. – Бюл. № 21. – 9 с.
70. Патент № 953759 СССР, МПК А61К39/395 (2006.01). Способ получения иммунной сыворотки : № 3250637/28-13 : заявл. 22.12.1980 : опубл. 15.06.1983 / Евдаков В. П., Мосалова Л. Ф., Нажмитдинов А. М., Петров Р. В., Савинова И. В., Хаитов Р. М. – Бюл. № 22. – 3 с.
71. Патоморфологические изменения при экспериментальной токсемии, вызванной термолабильным токсином *Yersinia pseudotuberculosis* / Л. М. Сомова, Н. Г. Плехова, Е. И. Дробот [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 67-72.
72. Петров, Р. В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – М.: "ГЭОТАР-Медиа", 2011. – 608 с.
73. Полиоксидоний: механизм действия и клиническое применение / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, А. В. Некрасов [и др.] / Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 271-278.
74. Получение и комплексная оценка диагностических сывороток к антигену *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенному с применением диметилсульфоксида / С. В. Иващенко, В. Э. Маниесон, К. А. Петченко [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2023. – № 1. – С. 125-130.
75. Получение специфических антител к клеточным мембранам *Xanthomonas campestris* / А. А. Щербаков, М. А. Кузнецов, С. В. Савина [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2017. – № 6. – С. 46-49.
76. Порообразующие белки наружной мембраны некоторых грамотрицательных бактерий. Структура и свойства // О. Д. Новикова, В. А. Хоменко, О. П. Вострикова [и др.] // Вестник ДВО РАН. – 2014. – № 1. – С. 120-134.



77. Применение твердофазного иммуноферментного анализа для серодиагностики псевдотуберкулеза / В.Б. Сбойчаков, А. М. Королюк, В. Н. Вербов [и др.] // ЖМЭИ. – 1986. – № 7. – С. 83-86.
78. Псевдотуберкулез / Г. П. Сомов, В. И. Покровский, Н. Н. Беседнова Ф. Ф. Антоненко. – М.: Медицина, 2001. – 256 с.
79. Псевдотуберкулез / И. А. Шурыгина, М. В. Чеснокова, В. Т. Климов, [и др.]. – Новосибирск: Наука, 2003. – 320 с.
80. Псевдотуберкулез в Новосибирской области и пути совершенствование эпидемиологического надзора / Л. К. Иванова, М. В. Чеснокова, В. Т. Климов [и др.] // Эпидемиол. и инф. болезни. – 2007. – № 6. – С. 7-11.
81. Руководство по медицинской микробиологии. В 2 кн. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Кн. 2 // Под ред. А. С. Лобинской, Н. Н. Костюковой, С. М. Ивановой // Иерсинии – возбудители псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза / Г. В. Ющенко. – М.: Изд-во БИНОМ, 2010. – С. 493-520.
82. Савина, С. В. Изучение влияния химической полиэлектролитной субстанции-адьюванта на эмбриотоксичность и тератогенность лабораторных животных / С. В. Савина, В. М. Скорляков // Аграрный научный журнал. – 2017. – № 12. – С. 48-50.
83. Саяпина, Л. В. Зарегистрированные медицинские иммунобиологические препараты для диагностики иерсиний / Л. В. Саяпина // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Матер. III Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 93-94.
84. Саяпина, Л. В. Состояние производства и внедрение новых препаратов для диагностики иерсиний / Л. В. Саяпина, А. Н. Малахаева, И. С. Барулина // Инфекции, обусловленные иерсиниями: материалы II Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2006. – С. 121-123.

85. Смирнова, Е. Ю. Совершенствование лабораторного обеспечения системы эпидемиологического надзора за иерсиниозами: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.33 / Смирнова Елена Юрьевна. – СПб., 2003. – 18 с.
86. Создание иммуноферментной тест-системы для индикации *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* у животных / А. Хаджу, С. В. Иващенко, С. В. Козлов [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2015. – Т. 74, № 3. – С. 57-60.
87. Софронова, О. Н. Микробиологические и экологические особенности штаммов иерсиний, циркулирующих на территории Якутии: автореф. дис. канд. мед. наук: 03.02.03 / Софронова Октябрина Николаевна. – СПб., 2014. – 26 с.
88. Сравнительная оценка двух тест-систем для идентификации энтеробактерий / Е. Б. Лазарева, Г. В. Залогеева, Л. Н. Никифорова, Д. Д. Меньшиков // Клин. лаб. диагност. – 1994. – № 1. – С. 50-51.
89. Сравнительное изучение некоторых физико-химических и иммунохимических свойств препаратов липополисахарида чумного микроба, выделенных разными методами / Т. А. Полунина, Н. П. Гусева, М. Н. Киреев [и др.] // Пробл. особо опасн. инфекц. – 2012. – Вып. 113. – С. 50-53.
90. Стенкова, А. М. Молекулярно-генетическая характеристика OMPF поринов бактерий рода *Yersinia* и разработка ПЦР тест-системы для идентификации патогенных видов: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.04 / Стенкова Анна Михайловна. – Владивосток, 2009. – 26 с.
91. Т-зависимые иммунорегуляторные эффекты полиоксидония и имунофана (обзор литературы) / Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова, М. Н. Михайлова, М. Захид // Вестник Чувашского университета. – 2010. – № 3. – С. 140-145.
92. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.

93. Термостабильный токсин *Yersinia pseudotuberculosis* вызывает разнонаправленные изменения уровней маркеров функциональной активности двух типов фагоцитов у голотурии *Eupentacta fraudatrix* / Л. С. Долматова, О. А. Уланова, М. П. Бынина, Н. Ф. Тимченко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – Т. 70, № 3. – С. 108-111.
94. Тимченко, Н. Ф. Актуальные вопросы микробиологии, клиники и диагностики дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, вызванной *Yersinia pseudotuberculosis* / Н. Ф. Тимченко, А. Ф. Попов, Б. Г. Андрюков // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. – Т. 60, № 2. – С. 94-100.
95. Тимченко, Н. Ф. Псевдотуберкулез – прошлое и настоящее / Н. Ф. Тимченко, А. Ф. Попов // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2014. – Т. 9, № 4. – С. 51-56.
96. Тимченко, Н. Ф. Развитие представлений о факторах патогенности возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (псевдотуберкулеза человека) / Н. Ф. Тимченко // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – Т. 31, № 4. – С. 93-99.
97. Тимченко, Н. Ф. Современные представления о механизмах, связанных с патогенностью *Yersinia pseudotuberculosis*, возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки / Н.Ф. Тимченко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – Т. 72, № 5. – С. 29-34.
98. Улучшенный метод выделения полисахаридов из грамотрицательных бактерий / В. А. Кульшин, А. П. Яковлев, С. Н. Аваева, Б. А. Дмитриев // Мол. генетика, микробиология, вирусология. – 1987. – № 5. – С. 44-46.
99. Фагоцитарная активность сополимеров N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина / С. А. Кедик, А. В. Панов, И. В. Сакаева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 55-56.
100. Физико-химические и антигенные свойства извлекаемых мочевиной поверхностных структур *Yersinia pseudotuberculosis* O:1B / А. В. Крюкова,

- Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12, № 4. – С. 659-667.
101. Хаитов, Р. М. Механизмы стимулирующего действия полиакриловой кислоты на антителогенез *in vitro*. Изучение дифференцировки поликлональных антителопродуцентов и клеток, секретирующих неспецифические иммуноглобулины / Р. М. Хаитов, Р. И. Атауллаханов, Е. В. Сидорова // Иммунология. – 1982. – № 5. – С. 31-34.
102. Хаитов, Р. М. Отмена иммунологической толерантности и эффекта Т-супрессоров синтетическими полиэлектролитами / Р. М. Хаитов, А. Ш. Норимов, С. Г. Завгородний // Иммунология. – 1980. – № 2. – С. 47-50.
103. Характеристика воздействия термолабильного летального токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на эмбриогенез и биосинтез ДНК, РНК и белка в эмбрионах морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* / Н. А. Терентьева, Н. Ф. Тимченко, Е. В. Персиянова, В. А. Рассказов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 81-84.
104. Ценёва, Г. Я. Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза: пособие для врачей / Г. Я. Ценёва. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 1997. – 64 с.
105. Ценева, Г. Я. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний / Г. Я. Ценева, Н. Ю. Солодовникова, Е. А. Воскресенская // Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. – 2002. – № 3. – С. 248-266.
106. Циркуляция возбудителей иерсиниозов на территории Воронежской области за период 2001-2010 гг. / М. И. Чубирко, В. М. Свердлов, Е. Г. Игнатова, Р. Т. Щёкина // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Матер. III Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 116-117.
107. Чеснокова, М. В. Анализ молекулярно-генетической variability *Yersinia pseudotuberculosis* / М. В. Чеснокова, В. Т. Климов, А. С. Марамович // Инфекции, обусловленные иерсиниями: материалы

- II Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2006. – С. 145-146.
108. Эпидемиологическая обстановка и профилактика зоонозных и природно-очаговых инфекционных болезней в Сибири и на Дальнем Востоке / С. В. Балахонов, М. В. Чеснокова, Е. И. Андаев [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 1. – С. 62-66.
109. Эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика и меры профилактики псевдотуберкулеза человека. Методические рекомендации, утверждённые Министерством здравоохранения РСФСР от 25.07.1988 г. – Москва, 1988. – 15 с.
110. Эпидемиология, лабораторная диагностика иерсиниозов, организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий. Инструкция, утверждённая Главным эпидемиологическим управлением Минздрава СССР от 30.10.1990 г. № 15-6/42. – Москва, 1990. – 27 с.
111. Эффективность обнаружения возбудителя псевдотуберкулеза в различных вариантах иммуноферментного анализа / О. А. Мальянова, З. Л. Девдариани, М. С. Веренков, С. А. Коровкин // Пробл. особо опасн. инфекц. – Саратов. – 1995. – Т. 77, № 1. – С. 177-183.
112. A rapid subtractive immunization method to prepare discriminatory monoclonal antibodies for food *E. coli* O157:H7 contamination / M. Jin, J. Lang, Z.-Q. Shen [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 2. – Article e31352.
113. A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 infection from iceberg lettuce / J. P. Nuorti, T. Niskanen, S. Hallanvuo [et al.] // J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 189, N 5. – P. 766-774.
114. Amphlett, A. Far East Scarlet-like Fever: A review of the epidemiology, symptomatology and role of superantigenic toxin: *Y. pseudotuberculosis*-derived mitogen A / A. Amphlett // Open Forum Infect. Dis. – 2015. – Vol. 3, N 1. – Article 202.

115. An outbreak of gastrointestinal illness and erythema nodosum from grated carrots contaminated with *Yersinia pseudotuberculosis* // K. Jalava, M. Hakkinen, M. Valkonen [et al.] // J. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 194, N 9. – P. 1209-1216.
116. Antibody response in *Yersinia pseudotuberculosis* III infection: analysis of an outbreak / T. H. Ståhlberg, R. Terti, H. Wolf-Watz [et al.] // J. Infect. Dis. – 1987. – Vol. 156, N 2. – P. 388-391.
117. Assessment of the efficacy of an autogenous vaccine against *Yersinia pseudotuberculosis* in young Merino sheep / K. J. Stanger, H. McGregor, M. Marena [et al.] // N. Z. Vet. J. – 2019. – Vol. 67, N 1. – P. 27-35.
118. Atkinson, S. *Yersinia* virulence factors – a sophisticated arsenal for combating host defences / S. Atkinson, P. Williams // F1000Res. – 2016. – N 5. – 1370.
119. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function / E. T. Rietschel, T. Kirikae, U. Schade [et al.] // FASEB J. – 1994. – Vol. 8, N 2. – P. 217-225.
120. Bhaduri, S. Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies / S. Bhaduri, P. H. Demchick // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – Vol. 6, N 4. – P. 941-943.
121. Bradfield, J. W. B. The mechanism of the adjuvant action of dextran sulphate / J. W. B. Bradfield, R. L. Souhami, J. E. Addison // Immunology. – 1974. – Vol. 26, N 2. – P. 383-392.
122. Bradford, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
123. Bruneteau, M. Lipopolysaccharides of bacterial pathogens from the genus *Yersinia*: a mini-review / M. Bruneteau, S. Minka // Biochimie. – 2003. – Vol. 85, N 1-2. – P. 145-152.
124. Carnoy, C. Superantigen YPMa exacerbates the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice / C. Carnoy, C. Mullet, H. Mullet-Alonf // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68, N 5. – P. 2553-2559.

125. Characterization of anti-ECA antibodies in rabbit antiserum against rough *Yersinia enterocolitica* O:3 / K. Rabsztyń, K. Kasperkiewicz, K. A. Duda [et al.]. // *Biochemistry (Mosc)*. – 2011. – Vol. 76, N 7. – P. 832-839.
126. Characterisation of non-pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from food and environmental samples / T. Niskanen, R. Laukkanen, A. Murros [et al.] // *Int. J. Food. Microbiol.* – 2009. – Vol. 129, N 2. – P. 150-156.
127. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A / E. T. Rietschel, L. Brade, K. Brandenburg [et al.] // *Rev. Infect. Dis.* – 1987. – N 9. – P. 527-236.
128. China, B. The pYV plasmid of *Yersinia* encodes a lipoprotein YlpA, related to TraT / B. China, B. Michiels, G. R. Cornelis // *Mol. Microbiol.* – 1990. – Vol. 4, N 9. – P. 1585-1593.
129. Clinical and microbiological follow-up of an outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 1b / N. Press, M. Fyfe, W. Bowie, M. Kelly / *Scand. J. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 33, N 7. – P. 523-526.
130. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Gilles, J. Hamilton [et al.] // *Analyt. Chem.* – 1956. – Vol. 28, N 3. – P. 350-356.
131. Community outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* / M. Inoue, H. Nakashima, T. Ueba [et al.] // *Microbiol. Immunol.* – 1984. – N 28. – P. 883-891.
132. Cornelis, G. R. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors / G. R. Cornelis // *J. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 153, N 3. – P. 401-408.
133. Development of a nano-gold immunodiagnostic assay for rapid on-site detection of invasive aspergillosis / K. M. Raval, V. Ghormade, P. R. Rajamohanam [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2019. – Vol. 68, N 9. – P. 1341-1352.

134. Development of the scheme of obtaining antibodies to the ribonucleoprotein of attenuated rabies virus / Y. K. Gavrilova, S. V. Generalov, M. N. Kireev [et al.] // Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. – 2019. – N 5. – P. 3-8.
135. Dot-immunogold filtration assay as a screening test for syphilis / Q. Huang, X. Lan, T. Tong [et al.] / J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34, N 8. – P. 2011-2013.
136. Dot immunogold filtration assay (DIGFA) for the rapid detection of specific antibodies against the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: *Metastrongyloidea*) using purified 31-kDa antigen / P. Eamsobhana, X. X. Gan, A. Ma [et al.] // J. Helmintho. – 2014. – Vol. 88, N 4. – P. 396-401.
137. Dykman, L. A. Use of the dot-immunogold assay for the rapid diagnosis of acute enteric infections / L. A. Dykman, V. A. Bogatyrev // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 27, N 2. – P. 135-137.
138. EFSA and ECDC (European food safety authority and european centre for disease prevention and control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013 // EFSA Journal. – 2015. – Vol. 13, N 1. – 3991. – 162 p.
139. El Tahir, Y. Yad A, the multifaceted Yesinia adhesion / Y. El Tahir, M. Skurnik // Int. J. Med. Microbiol. – 2001. – Vol. 291, N 3. – P. 209-218.
140. Enhancement of "Memory cell" pool by polyanions in mice / T. Diamantstein, B. Theden, R. Schmüderrich, J. Kielmann // Experientia. – 1973. – Vol. 29, N 6. – P. 707-708.
141. Erridge, C. Structure and function of lipopolysaccharides / C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, I. R. Poxton // Microbes Infect. – 2002. – Vol. 4, N 8. – P. 837-851.
142. European food safety authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2009 // EFSA J. – 2011. – N 9. – P. 210-214.



143. Evaluation of immunoassays for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection using archived sera / J. Xu, R. W. Peeling, J.-X. Chen [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2011. – Vol. 5, N 1. – Article e949.
144. Evaluation of rapid dot-immunoassay for detection orthopoxviruses using laboratory-grown viruses and animal's clinical specimens / N. Ushkalenko, A. Ersh, A. Sergeev [et al.] // Viruses. – 2022. – Vol. 14, N 11. – Article 2580.
145. Evaluation on the applied value of the dot immunogold filtration assay (DIGFA) for rapid detection of anti-*Schistosoma japonicum* antibody / L.-Y. Wen, J.-H. Chen, J.-Z. Ding [et al.] // Acta Trop. – 2005. – Vol. 96, N 2-3. – P. 142-147.
146. Fällman, M Yersinia proteins that target host cell signaling pathways / M. Fällman, C. Persson, H. Wolf-Watz // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol. 99, N 6. – P. 1153-1157.
147. Fast and sensitive detection of enteropathogenic Yersinia by immunoassays / J. Laporte, C. Savin, P. Lamourette [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53, N 1. – P. 146-159.
148. Fatal yersiniosis in farmed deer caused by *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:3 encoding a mannosyltransferase-like protein WbyK. / S. Zhang, Z. Zhang, S. Liu [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2008. – Vol. 20, N 3. – P. 356-359.
149. Fredriksson-Ahomaa, M. Isolation of enteropathogenic yersinia from non-human sources/ M. Fredriksson-Ahomaa // Adv. Exp. Med. Bio. – 2012. – Vol. 954, N 3. – P. 97-105.
150. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // Nature Phys. Sci. – 1973. – Vol. 241, N 105. – P. 20-22.
151. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula / E. Claassen, W. Leeuw, P. Greeve [et al.] // Res. Immunol. – 1992. – Vol. 143, N 5. – P. 478-483.

152. Fukushima, H. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools / H. Fukushima, Y. Tgunomori, K. Seki // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, N 11. – P. 5134-5146.
153. Fukushima, H. Molecular epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* / H. Fukushima // Adv. Exp. Med. Biol. – 2003. – Vol. 529. – P. 357-358.
154. Fukushima, H. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* detection in foods / H. Fukushima, S. Shimizu, Y. Inatsu // J. Pathog. – 2011. – Vol. 2011. – Article e735308.
155. Geographical heterogeneity between Far eastern and western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis* – derived mitogen, and the high – pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains / H. Fukushima, Y. Matsuda, R. Seki [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39, N 10. – P. 3541-3547.
156. Hallanvuo, S. Foodborne *Yersinia*. Identification and molecular epidemiology of isolates from human infection / S. Hallanvuo: Academic dissertation. – Helsinki, Finland, 2009. – 132 p.
157. Identification of pathogenic strains within serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis* and the presence of non-pathogenic strains isolated from animals and the environment / T. Nagano, T. Kiyohara, K. Suzuki [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 1997. – Vol. 59, N 3. – P. 153-158.
158. Identification of *Yersinia* species by the Vitek GNI card / H. J. Linde, H. Neubauer, H. Meyer [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37, N 1. – P. 211-214.
159. Immunogenic properties of lipid A / C. Galanos, M. A. Freudenberg, F. Jay [et al.] // Rev. Infect. Dis. – 1984. – Vol. 6, N 4. – P. 546-552.
160. Immunostimulatory effect of gold nanoparticles conjugated with transmissible gastroenteritis virus / S. A. Staroverov, I. V. Vidyasheva, K. P. Gabalov [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. – 2011. – Vol. 151, N 4. – P. 436-439.

161. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum* – wheat root interaction / S. A. Konnova, O. E. Makarov, I. M. Skvortsov, V. V. Ignatov // FEMS Microbiol. Lett. – 1994. – Vol. 118. – P. 93-99.
162. Kabanov, D. S. Structural analysis of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria / D. S. Kabanov, I. R. Prokhorenko // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75, N 4. – P. 383-404.
163. Kaneko, S. Evaluation of enzyme immunoassay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains / S. Kaneko, T. Maruyama // J. Clin. Microbiol. – 1989. – Vol. 27, N 4. – P. 748-751.
164. Kuhn, H. M. ECA, the enterobacterial common antigen / H. M. Kuhn, U. Meier-Dieter, H. Mayer / FEMS Microbiol. Rev. – 1988. – Vol. 4, N 3. – P. 195-222.
165. L'Age-Stehr, J. Suppression and potentiation of expression of delayed-type hypersensitivity by dextran sulphate / J. L'Age-Stehr, T. Diamantstein // Immunology. – 1977. – Vol. 33, N 2. – P. 179-183.
166. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680-685.
167. Lambertz, S. T. Tag-Man based real-time PCR method for detection of *Yersinia pseudotuberculosis* in food / S. T. Lambertz, C. Nilsson, S. Hallanvuo // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74, N 20. – P. 6465-6469.
168. Leontein, K. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols / K. Leontein, B. Lindberg, J. Lonngren // Carbohydr. Res. – 1978. – Vol. 62. – P. 359-362.
169. Lipid A, the lipid component of bacterial LPS: relation of chemical structure to biological activity / E. T. Rietschel, H. W. Wollenweber, U. Zahringier, O. Luderitz // Klin. Wschr. – 1982. – Vol. 60, N 14. – P. 705-709.

170. 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.
171. Mayer, H. Analysis of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria / H. Mayer, R. N. Tharanathan, J. Weckesser // Methods Microbiol. – 1985. – Vol. 18. – P. 157-207.
172. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann / J. Immunol Methods. – 1983. – Vol. 65, N 1-2. – P. 55-63.
173. Multiple outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* infections in Finland / K. Jalava, S. Hallanvuo, U.M. Nakari [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, N 6. – P. 2789-2791.
174. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 2/O:9 and *Yersinia pseudotuberculosis* 1/O:1 strains isolated from human and non-human sources in the Plateau State of Nigeria / A. E. J. Okwori, P. O. Martínez, M. Fredriksson-Ahomaa [et al.] // Food Microbiol. – 2009. – Vol. 26, N 8. – P. 72-75.
175. Preliminary study of a dot immunogold filtration assay for rapid detection of anti-HCV IgG / L.-Y. Xiao, X.-J. Yan, M.-R. Mi [et al.] // World. J. Gastroenterol. – 1999. – Vol. 5, N 4. – P. 349-350.
176. Preliminary survey regarding yersiniosis in Ireland / T. Ringwood, B. P. Murphy, N. Drummond [et al.] // Adv. Exp. Med. Bio. – 2012. – Vol. 954, N 2. – P. 59-61.
177. Preparation and optical scattering characterization of gold nanorods and their application to a dot-immunogold assay / A. V. Alekseeva, V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman [et al.] // Appl. Opt. – 2005. – Vol. 44, N 29. – P. 6285-6295.
178. Preparation and preclinical evaluation of a novel liposomal complete-core lipopolysaccharide vaccine / E. Bennett-Guerrero, T. J. McIntosh, G. R. Barclay [et al.] // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68, N 11. – P. 6202-6208.

179. Prevalence and genetic diversity of enteropathogenic *Yersinia spp.* in pigs at farms and slaughter in Lithuania / A. Novoslavskij, L. Serniene, A. Malakauskas [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2013. – Vol. 94, N 2. – P. 209-213.
180. Prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad region) pigs / P. O. Martinez, M. Fredriksson-Ahomaa, Y. Sokolova [et al.] // Foodborne Pathog. Dis. – 2009. – Vol. 6, N 6. – P. 719-724.
181. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland / M. Fredriksson-Ahomaa, S. Wacheck, M. Koenig, R. Stephan // Int. J. Food Microbiol. – 2009. – Vol. 135, N 3. – P. 199-202.
182. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pigs in Zuru local government area, Kebbi state / M. S. Jibrin, P. C. Mshelia, S. Garba [et al.] // SJVA. – 2013. – Vol. 2, N 12. – P. 189-196.
183. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in the Basque Country, northern Spain / M. Arrausi-Subiza, X. Gerrikagoitia, V. Alvarez [et al.] // Acta. Vet. Scand. – 2016. – N 58. – Article 4.
184. Pseudotuberculosis in the Russian Federation / G. Y. Tseneva, M. V. Chesnokova, V. T. Klimov [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 2012. – Vol. 954, N 2. – P. 63-68.
185. Purification, characterization and cloning of a novel variant of the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis* – derived mitogen / T. K. Ramamurthy, K. Yoshino, J. Abe [et al.] // FEBS Letters. – 1997. – Vol. 413, N 1. – P. 174-176.
186. Rapid detection of aflatoxin B(1) on membrane by dot-immunogold filtration assay / Y. Ye, Y. Zhou, Z. Mo [et al.] // Talanta. – 2010. – Vol. 81, N 3. – P. 792-798.

187. Rapid detection of ochratoxin A on membrane by dot immunogold filtration assay / W. Chen, Y. Jin, A. Liu, [et al.] // J. Sci. Food Agric. – 2016. – Vol. 96, N 2. – P. 610-614.
188. Rastawicki, W. Humoral response to selected antigens of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in the course of yersiniosis in humans. I. Occurrence of antibodies to enterobacterial common antigen (ECA) / W. Rastawicki // Med. Dosw. Mikrobiol. – 2007. – Vol. 59, N 2. – P. 93-102.
189. Rastawicki, W. Humoral response to selected antigens of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in the course of yersiniosis in humans. I. Occurrence of antibodies to *Yersinia lipopolisacharydes* and Yop proteins by ELISA / W. Rastawicki // Med. Dosw. Mikrobiol. – 2006. – Vol. 58, N 4. – P. 303-319.
190. Relation between serology of meat juice and bacteriology of tonsils and feces for the detection of enteropathogenic *Yersinia spp.* in pigs at slaughter / I. Van Damme, G. Vanantwerpen, D. Berkvens, L. De Zutter // Foodborne Pathog. Dis. – 2014. – Vol. 11, N 8. – P. 596-601.
191. Revell, P. A. *Yersinia* virulence: more than a plasmid / P. A. Revell, V. L. Miller // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – Vol. 205, N 2. – P. 159-164.
192. Ribotyping and virulence markers of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from animals in Brazil / C. H. G. Martins, T. M. Bauab, C. Q. F. Leite, D. P. Falcão // Mem. Inst. Oswaldo Cruz – 2007. – Vol. 102, N 5. – P. 587-592.
193. Sandwich dot-immunogold filtration assay (DIGFA) for specific immunodiagnosis of active neuroangiostrongyliasis / P. Eamsobhana, A. Tungtrongchitr, H.-S. Yong [et al.] // Parasitology. – 2021. – Vol. 148, N 2. – P. 234-239.
194. Sawardecker, J. S. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography / J. S. Sawardecker, J. H. Sloneker, A. Jeans // Anal. Chem. – 1965. – Vol. 37, N 12. – P. 1602-1603.

195. Serological characterization of the enterobacterial common antigen substitution of the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:3 / M. Noszczyńska, K. Kasperkiewicz, K. A. Duda [et al.] // *Microbiology (Reading)*. – 2015. – Vol. 161, N 1. – P. 219-227.
196. Silver enhanced nano-gold dot blot immunoassay for leptospirosis / V. Raja, M. Prasad, P. Bothammal [et al.] // *J. Microbiol. Methods*. – 2019. – N 156. – P. 20-22.
197. Skurnik, M. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae* / M. Skurnik, J. A. Bengoechea // *Carbohydr. Res.* – 2003. – Vol. 338, N 23. – P. 2521-2529.
198. Sonnevend, A. *Yersinia* Yop-specific IgA antibodies in Hungarian blood donors / A. Sonnevend, E. Czirók, T. Pál // *Folia. Microbiol. (Praha)*. – 2005. – Vol. 50, N 3. – P. 269-272.
199. Spontaneous Yersiniosis due to *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 7 in a squirrel monkey / S. Nakamura, H. Hayashidani, T. Iwata [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 71, N 12. – P. 1657-1659.
200. Stills, H. F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants / H. F. Stills // *ILAR J.* – 2005. – Vol. 46, N 3. – P. 280-293.
201. Stimulation of humoral antibody formation by polyanions. IV. The effects of dextran sulfate on the kinetics of secondary immune response in mice / T. Diamantstein, B. Wagner, M. V. Odenwald, G. Schulz // *Europ. J. Immunol.* – 1971. – Vol. 1, N 6. – P. 426-429.
202. Stott, D. I. Immunoblotting and dot blotting / D. I. Stott // *J. Immunol. Methods*. – 1989. – Vol. 119, N 2. – P. 153-87.
203. The serotyping of *Azospirillum spp.* by cell-gold immunoblotting / V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman, L. Yu. Matora, B. I. Schwartsburd // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1992. – Vol. 75, N 2-3. – P. 115-118.

204. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome / G. R. Cornelis, A. Boland, A. P. Boyd [et al.] // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – Vol. 62, N 4. – P. 1315-1352.
205. Thoerner, P. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution / P. Thoerner, C. I. B. Kingombe, K. Bogli-Stuber [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, N 3. – P. 1810-1816.
206. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: journal.* – 1979. – Vol. 76, N 9. – P. 4350-4354.
207. Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse / R. Laukkanen, P. O. Martinez, K.-M. Siekkinen [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74, N 17. – P. 5444-5450.
208. Use of a synthetic foot-and-mouth disease virus peptide conjugated to gold nanoparticles for enhancing immunological response / L. A. Dykman, S. A. Staroverov, P. V. Mezheny [et al.] // *Gold Bull.* – 2015. – Vol. 48, N 1-2. – P. 93-101.
209. Use of O-antigen gene cluster – specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* / T. M. Bogdanovich, E. Carniel, H. Fukushima, M. Skurnik // *J. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, N 11. – P. 5103-5112.
210. Variation in the prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in slaughter pigs from Belgium, Italy, and Spain / P. O. Martinez, M. Fredriksson-Ahomaa, A. Pallotti [et al.] // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2011. – Vol. 8, N 3. – P. 445-450.
211. VirF-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden / T. Niskanen, J. Waldenstrom, M. Fredriksson-Ahomaa [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, N 8. – P. 4670-4675.



212. Virulence characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from breeding monkeys in Japan / T. Iwata, Y. Une, A. T. Okatani [et al.] // Vet. Microbiol. – 2008. – Vol. 129, N 3-4. – P. 404-409.
213. Wang, X. Development of dot-immunogold filtration assay to detect white spot syndrome virus of shrimp / X. Wang, W. Zhan, J. Xing // J. Virol. Methods. – 2006. – Vol. 132, N 1-2. – P. 212-215.
214. Warth, J. F. G. *Yersinia pseudotuberculosis* O-III causes diarrhea in Brazilian cattle / J. F. G. Warth, S. M. Biesdorf, C. Souza // Adv. Exp. Med. Bio. – 2012. – Vol. 954, N 3. – P. 107-110.
215. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure / O. Westphal, K. Jann // Methods. Carbohydr. Chem. – 1965. – N 5. – P. 83-91.
216. Wide variety of bioserotypes of enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of English pigs at slaughter / P. O. Martinez, S. Mylona, I. Drake [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2010. – Vol. 139, N 1-2. – P. 64-69.
217. Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens / S. Wacheck, M. Fredriksson-Ahomaa, M. König [et al.] // Foodborne Pathog. Dis. – 2010. – Vol. 7, N 3. – P. 307-312.
218. Within-batch prevalence and quantification of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in tonsils of pigs at slaughter / G. Vanantwerpen, I. Van Damme, L. De Zutter, K. Houf // Vet. Microbiol. – 2014. – Vol. 169, N 3-4. – P. 223-227.
219. Wu, B. A new immune complex dot assay for detection of rotavirus antigen in faeces / B. Wu, J. B. Mahony, M. A. Chernesky // J. Virol. Methods. – 1990. – Vol. 29, N 2. – P. 157-166.
220. *Yersinia* adhesin A (YadA)-beauty & beast / M. Mühlenkamp, P. Oberhettinger, J. C. Leo [et al.] // Int. J. Med. Microbiol. – 2015. – Vol. 305, N 2. – P. 252-258.

221. *Yersinia pseudotuberculosis* causing a large outbreak associated with carrots in Finland, 2006 / R. Rimhanen-Finne, T. Niskanen, S. Hallanvuo [et al.] // *Epidemiol. Infect.* – 2009. – Vol. 137, N 5. – P. 342-347.
222. *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:1 infection in a captive Seba's short tailed-fruit bat (*Carollia perspicillata*) colony in Switzerland / K. Hahn, I. B. Veiga, M. Schediwy [et al.] / *BMC Vet. Res.* – 2021. – Vol. 17, N 1. – Article e92.
223. *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 traced to raw carrots / S. Kangas, J. Takkinen, M. Hakkinen [et al.] // *Finland. Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 14, N 12. – P. 1959-1961.
224. *Yersinia* species isolated from bats, Germany / K. Muhldorfer, G. Wibbelt, J. Haensel [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 16, N 3. – P. 578-580.
225. Yersiniosis as a gastrointestinal disease / R. Leino, K. Granfors, T. Havia [et al.] // *Scand. J. Infect. Dis.* – 1987. – Vol. 19, N 1. – P. 63-68.

**ПРИЛОЖЕНИЯ**

УТВЕРЖДАЮ:  
Ректор ФГБОУ ВО  
Вавиловский университет  
Д.А. Соловьев  
" 22 " августа 2023 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению иммуноферментной тест-системы  
для ускоренного выявления возбудителя псевдотуберкулёза животных  
в среде накопления (фосфатно-солевом буфере (ФСБ))

### 1. Продукт:

иммуноферментная тест-система для ускоренного выявления возбудителя псевдотуберкулёза (*Yersinia pseudotuberculosis*) животных в ФСБ на третьи и более сутки его "холодового обогащения".

### 2. В состав набора входят:

- планшет для иммуноферментного анализа (ИФА) – 1 шт.;
- антиген псевдотуберкулёзный для контроля, 10 мкг;
- таблетки ФСБ рН=7,2-7,6, 1 г – 7 шт.;
- твин-20 – 0,25 мл;
- бычий сывороточный альбумин (БСА) – 0,4 г;
- сыворотка диагностическая псевдотуберкулёзная, полученная от морской свинки – 25 мкл;
- сыворотка диагностическая к псевдотуберкулёзная, полученная от кролика – 50 мл;
- сыворотка крови морской свинки для отрицательного контроля – 25 мкл;
- антитела к иммуноглобулину G кролика, меченные пероксидазой хрена (антивидовой конъюгат) с активностью 1:20000 – 10 мкл;
- лимонная кислота – 0,48 г и натрия фосфат однозамещённый – 0,89 г;
- орто-фенилендиамин (ОФД) – 15 мг;
- таблетки гидроперита, 1,5 г – 1 шт.;
- 2 н соляная кислота (стоп-раствор) – 12,5 мл.

### 3. Внешний вид компонентов:

- сыворотки диагностические и отрицательные – прозрачные, слегка желтоватые жидкости;
- антивидовой конъюгат, стоп-раствор – прозрачные и бесцветные жидкости;
- твин-20 – густая, прозрачная, слегка желтоватая жидкость;
- таблетки ФСБ рН=7,2-7,6 и гидроперита – твёрдые, белого цвета;

- антигены для контроля, лимонная кислота, натрия фосфат однозамещённый – порошки белого цвета;
- ОФД – пластины бежевого цвет;
- БСА – пластины белого цвета.

#### 4. Биологические свойства:

Сыворотки диагностические псевдотуберкулёзные получены иммунизацией морской свинки и кролика дезинтегрированными мембранами псевдотуберкулёзного микроба и способны выявлять клетки *Y. pseudotuberculosis* в ФСБ с рН=7,6-7,8, на третьи и более сутки их "холодового обогащения". Образовавшийся комплекс антиген-антитело определяется посредством конъюгата и субстрата по изменению окраски содержимого лунки.

#### 5. Способ применения:

##### *Приготовление растворов.*

Раствор №1. Таблетки ФСБ рН=7,2-7,6 растворить в 0,7 литре дистиллированной воды. Раствор хранить не более 1 месяца при температуре 4°C.

Раствор №2. Твин-20 растворить в 0,5 литре раствора №1. Раствор хранить не более 10 суток при температуре 4°C.

Раствор №3. БСА растворить в 22 мл раствора №1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №4. Антиген псевдотуберкулёзный для контроля растворить в 1 мл раствора №1.

Раствор №5. Сыворотку диагностическую псевдотуберкулёзную, полученную от морской свинки, растворить в 5 мл раствора №1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №6. Сыворотку диагностическую псевдотуберкулёзную, полученную от кролика растворить в 12 мл раствора №1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №7. Сыворотку крови морской свинки для отрицательного контроля растворить в 5 мл раствора №1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №8. Антивидовой конъюгат растворить в 12 мл раствора №1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №9. Растворить лимонную кислоту и натрия фосфат однозамещённый в 12,5 мл дистиллированной воды. Раствор хранить не более 1 месяца при температуре 4°C.

Раствор №10. ОФД растворить в 12,5 мл раствора №9. Раствор готовят не ранее, чем за 10 минут до использования.

Раствор №11. Таблетку гидроперита растворить в 10 мл дистиллированной воды. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №12. Внести 0,15 мл раствора №11 в 12,5 мл раствора №10. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

*Проведение ИФА*

Планшет используется однократно. Исследуемый материал предварительно обрабатывается 1%-м формалином 4 часа.

1. В нечётные ряды лунок планшета вносят по 100 мкл раствора №5, а в чётные ряды – по 100 мкл раствора №7 (отрицательный контроль).

2. Инкубируют планшеты на термостатируемом шейкере 60 минут при температуре 37°C.

3. Несорбированный материал удаляют из лунок сильным вытряхиванием и трёхкратным промыванием каждой лунки 300 мкл раствора №2.

4. Во все лунки планшета вносят по 200 мкл раствора №3.

5. Инкубируют планшеты на термостатируемом шейкере 30 минут при температуре 37°C.

6. Несорбированный материал удаляют из лунок, как указано в п. 3.

7. В 1-ю лунку первого ряда планшета добавляют 100 мкл раствора №4 (положительный контроль). В остальные лунки планшета вносят пробы исследуемой среды накопления (ФСБ) с фекалиями. Исследование каждой пробы проводят внесением её в соответствующие лунки чётного и нечётного рядов планшета.

8. Планшеты инкубируют, как указано в п. 5.

9. Несорбированный материал удаляют из лунок, как указано в п. 3.

10. В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора №6.

11. Планшеты инкубируют, как указано в п. 5.

12. Несорбированный материал удаляют из лунок, как указано в п. 3.

13. В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора №8.

14. Планшеты инкубируют, как указано в п. 5.

15. Несорбированный материал удаляют из лунок, как указано в п. 3.

16. В лунки, использованные в п. 1, вносят по 100 мкл раствора №12.

17. Инкубируют планшеты 5 минут при температуре 37°C.

18. В лунки вносят при помощи восьмиканального дозатора по 100 мкл стоп-раствора.

*Учёт результатов* проводят на планшетном фотометре при длине волны 490 нм. Сначала учитывают реакцию с контрольным антигеном (положительный контроль). Он должен иметь значение оптической плотности (ОП) не менее 0,3.

Затем учитывали результаты оптической плотности в лунках с исследуемыми пробами. В положительных пробах результаты чётного и нечётного рядов должны отличаться в 2 и более раз, а значение ОП в нечётном ряду должно быть не менее 0,15 на 3 сутки "холодового обогащения" фекалий.

## 6. Условия хранения:

- контрольный антиген хранить не более 1 месяца при температуре 4°C;
- стоп-раствор хранить не более 1 месяца при температуре не выше 20°C
- сыворотки диагностические и отрицательную, а также антивидовой конъюгат хранить не более 1 года при температуре минус 16°C;
- БСА хранить не более 1 года при температуре 4°C в сухом месте;
- остальные компоненты тест-системы хранить не более 1 года при температуре не выше 20°C в сухом, тёмном месте.

## Составители:

Доцент кафедры микробиологии  
и биотехнологии ФГБОУ ВО  
Вавиловский университет



С.В. Иващенко

Выпускник аспирантуры кафедры  
микробиологии и биотехнологии  
ФГБОУ ВО Вавиловский университет



В.С. Кузнецова

УТВЕРЖДАЮ:  
Ректор ФГБОУ ВО  
Вавиловский университет  
Д.А. Соловьев  
" 22 " августа 2023 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению дот-иммунотест-системы для ускоренного выявления возбудителя псевдотуберкулёза животных в средах накопления

### 1. Продукт:

дот-иммунотест-система с конъюгатом золотых наночастиц (ЗНЧ) для ускоренного выявления возбудителя псевдотуберкулёза животных (*Yersinia pseudotuberculosis*) в средах накопления на третьи и более сутки их "холодового обогащения".

### 2. В состав набора входят:

- нитроцеллюлозная мембрана (НЦ-мембрана), разлинованная на квадраты площадью 5×5 мм, с диаметром пор 0,2 мкм – 4×6 см (8 рядов по 12 квадратов);
- пленка "Parafilm M" – 8 кусков площадью 3×7 см;
- антиген псевдотуберкулёзный для контроля, 0,1 млрд. клеток/мл – 0,5 мл;
- таблетки фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с рН=7,2-7,6, 1 г – 3 шт.;
- твин-20 – 0,1 мл;
- бычий сывороточный альбумин (БСА) – 0,8 г;
- сыворотка диагностическая псевдотуберкулёзная кроличья – 0,05 мл;
- сыворотка нормальная кроличья – 0,05 мл;
- белок А стафилококка рекомбинантный, конъюгированный с ЗНЧ диаметром 15 нм – 1 мл;

### 3. Внешний вид компонентов:

- сыворотки диагностическая и нормальная кроличьи – прозрачные, слегка желтоватые жидкости;
- конъюгат белка А с ЗНЧ – прозрачная, красная жидкости;
- твин-20 – густая, прозрачная, слегка желтоватая жидкость;
- антиген для контроля – взвесь белого цвета (после встряхивания);
- таблетки ФСБ рН=7,2-7,6 – твёрдые, белого цвета;
- БСА – мелкие пластины белого цвета.

### 4. Биологические свойства:

Сыворотка диагностическая псевдотуберкулёзная получена иммунизацией кролика дезинтегрированными мембранами псевдотуберкулёзного микроба и способна выявлять клетки *Y. pseudotuberculosis* в средах



накопления: 1%-й забуференной пептонной воде (1% ЗПВ) и ФСБ с рН=7,6-7,8, на третьи и более сутки их "холодового обогащения". Образовавшийся комплекс антиген-антитело определяется посредством конъюгата по окрашиванию пятен на НЦ-мембране в розовый цвет.

#### 5. Способ применения:

##### *Приготовление растворов.*

Раствор №1. Таблетки ФСБ рН=7,2-7,6 растворить в 300 мл дистиллированной воды. Раствор хранить не более 1 месяца при температуре 4°C.

Раствор №2. Твин-20 растворить в 200 мл раствора №1. Раствор хранить не более 10 суток при температуре 4°C.

Раствор №3. БСА растворить в 40 мл раствора №1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №4. Сыворотку диагностическую псевдотуберкулёзную растворить в 5 мл раствора №1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №5. Сыворотку нормальную кроличью растворить в 5 мл раствора №1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор №6. Конъюгат белка А с ЗНЧ растворить в 9 мл дистиллированной воды. Раствор хранению не подлежит.

##### *Проведение ДИА (дот-иммуноанализа)*

НЦ-мембрана используется однократно и позволяет одновременно исследовать до 22 пробы. Исследуемый материал предварительно обрабатывается 1%-м формалином 4 часа.

1. На 1-й квадрат 2-го ряда наносят 4 мкм псевдотуберкулёзного антигена (положительный контроль (ПК)). Антиген предварительно перемешивается встряхиванием пробирки. (см. рис. 1)

	ПК	Номера проб										
	↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 ряд												
2 ряд	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
3 ряд		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4 ряд		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
5 ряд		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
6 ряд		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
7 ряд		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
8 ряд		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

Рисунок 1 – Схема нанесения проб на НЦ-мембрану

2. Оставшиеся квадраты 2, 4, 6, 8 рядов используют для внесения проб. Одну пробу вносят в соответствующие квадраты 2 и 4 рядов или 6 и 8 рядов.

Ряды 4 и 8 являются отрицательными контролями. Квадраты 1, 3, 5, 7 рядов используют для обозначения проб. (см. рис. 1)

3. Подсушивают мембрану при 37°C в течение 45 минут.

4. В чашку Петри вносят 40 мл раствора №3 и помещают в раствор НЦ-мембрану с нанесёнными на неё пятнами антигена.

5. Инкубируют чашку Петри с мембраной на термостатируемом шейкере 45 минут при температуре 37°C.

6. Несорбированный материал удаляют с мембраны промыванием раствором №2 в чашке Петри.

7. Разрезают мембрану на 4 полосы: 1+2 ряды, 3+4 ряды, 5+6 ряды, 7+8 ряды. Помещают полосы в пакетики, сделанные из пленки "Parafilm M". Вносят в пакетики с рядами 1+2 и 5+6 раствор №4, а в пакетики с рядами 3+4 и 7+8 раствор №5. После внесения соответствующего раствора пакетик сразу запаивают, проводя заточенным карандашом по соединённым слоям плёнки (пунктирная линия на рис. 2)

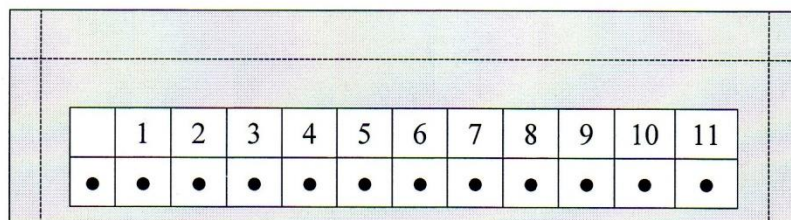


Рисунок 2 – Схема размещения полосы НЦ-мембраны в пакете из пленки "Parafilm M"

8. Инкубируют пакетики с полосами мембраны на термостатируемом шейкере 45 минут при температуре 37°C.

9. Полосы мембраны вынимают из пакетиков и несорбированный материал удаляют с мембраны, как указано в п. 6.

10. Помещают полосы мембраны в пакетики, сделанные из пленки "Parafilm M", вносят в пакетик раствор №6 и запаивают пакетик.

11. Инкубируют пакетики с мембранами 6 часов при комнатной температуре.

12. Полосы мембраны вынимают из пакетиков и промывают, как указано в п. 6.

*Учёт результатов* проводят визуально. Сначала учитывают наличие положительного контроля и полос мембраны с отрицательными контролями.

После учёта контролей приступают к оценке взаимодействия исследуемых проб с диагностической сывороткой.

Наличие на мембране розовых пятен свидетельствует о положительной реакции.

## 6. Условия хранения:

- контрольные антигены хранить не более 1 месяца при температуре 4°C;
- сыворотку диагностическую, нормальную кроличью и конъюгат хранить не более 1 года при температуре минус 16°C;
- БСА хранить не более 1 года при температуре 4°C в сухом месте;
- остальные компоненты тест-системы хранить не более 1 года при температуре не выше 20°C в сухом, тёмном месте.

Составители:

Доцент кафедры микробиологии  
и биотехнологии ФГБОУ ВО  
Вавиловский университет



С.В. Иващенко

Выпускник аспирантуры кафедры  
микробиологии и биотехнологии  
ФГБОУ ВО Вавиловский университет



В.С. Кузнецова

АКТ от 13 ноября 2018 г.

Настоящий акт составлен в том, что нами: ветеринарным врачом ОГУ "Балаковская рай СББЖ" Матяш В.В., доцентом ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ Иващенко С.В., аспирантом ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ Маниесоном В.Э., в присутствии представителя КФХ Гулякин А.В., ИП Главы КФХ Гулякина А.В., проведено исследование на псевдотуберкулёз и кишечный иерсиниоз свиней, принадлежащих КФХ "Гулякин А.В.", г. Балаково Балаковского района.

Подвергнуты исследованию фекалии от 80 свиней 2-4-х месячного возраста. Исследования проводились бактериологическим методом.

В результате проведённых исследований псевдотуберкулёзный микроб обнаружен у 1 свиньи. Кишечноиерсиниозный микроб выделен от 3 свиней.

К акту прилагается опись исследованных животных с результатами исследований на 3 листах. Акт составлен в 3 экземплярах.

**Подписи:**

**Ветеринарный врач**

**ОГУ "Балаковская рай СББЖ"**

**Доцент ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ**

**Аспирант ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ**

**ИП Глава КФХ "Гулякин А.В."**



**Матяш В.В.**

**Иващенко С.В.**

**Маниесон В.Э.**

**Гулякин А.В.**

АКТ от 16 апреля 2019 г.

Настоящий акт составлен в том, что нами: ветеринарным врачом ОГУ "Краснопартизанская рай СББЖ" Земцовым А.С., доцентом ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ Иващенко С.В., аспирантом ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ Маниесоном В.Э., в присутствии представителя СПК "Заря" заведующего фермой № 4 Шаяхметовым В.Н. проведено исследование на псевдотуберкулёз и кишечный иерсиниоз свиней и КРС, принадлежащих СПК "Заря", с. Большая Сакма Краснопартизанского района.

Подвергнуты исследованию фекалии от 80 свиней и 40 телят 2-4-х месячного возраста. Исследования проводились бактериологическим методом.

В результате проведённых исследований псевдотуберкулёзный микроб обнаружен у 4 телят и 2 свиней. Кишечноиерсиниозный микроб выделен от 2 телят и 5 свиней.

К акту прилагается опись исследованных животных с результатами исследований на 4 листах. Акт составлен в 3 экземплярах.

Подписи:

Ветеринарный врач

ОГУ "Краснопартизанская рай СББЖ"

Земцов А.С.

Доцент ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Иващенко С.В.

Аспирант ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Маниесон В.Э.

Заведующий фермой № 4 СПК "Заря"

Шаяхметов В.Н.



АКТ от 12 мая 2020 г.

Настоящий акт составлен в том, что нами: ветеринарным врачом ОГУ "Ершовская рай СББЖ" Хайралаповым М.С., доцентом ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ Иващенко С.В., аспирантом ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ Маниесоном В.Э., в присутствии представителя АО «Декабрист» генерального директора Алюшина С.П. проведено исследование на кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулёз КРС, принадлежащего АО «Декабрист», п. Целинный Ершовского района.

Подвергнуты исследованию фекалии 40 телят 5 месячного возраста. Исследования проводились бактериологическим методом.

В результате проведённых исследований псевдотуберкулёзный микроб выделен от 4 телят.

К акту прилагается опись исследованных животных с результатами исследований на 2 листах. Акт составлен в 3 экземплярах.

Подписи:

Ветеринарный врач

ОГУ "Ершовская рай СББЖ"

Хайралапов М.С.

Доцент ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Иващенко С.В.

Аспирант ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Маниесон В.Э.

Генеральный директор АО «Декабрист»

Алюшин С.П.



АКТ от 22 апреля 2020 г.

Настоящий акт составлен в том, что нами: ветеринарным врачом ОГУ "Краснопартизанская рай СББЖ" Земцовым А.С., доцентом ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ Иващенко С.В., аспирантом ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ Маниесоном В.Э., в присутствии представителя СПК "Заря" заведующего фермой № 4 Шаяхметовым В.Н. проведено исследование на псевдотуберкулёз и кишечный иерсиниоз телят, принадлежащих СПК "Заря", с. Большая Сакма Краснопартизанского района.

Подвергнуты исследованию фекалии от 50 телят 2-4-х месячного возраста. Исследования на псевдотуберкулёз проводились бактериологическим и иммунологическими (ДИА, ИФА) методами, а на кишечный иерсиниоз – бактериологическим методом. Для иммунологической диагностики псевдотуберкулёза использовали экспериментальные иммунодот- и иммуноферментную тест-системы, созданные на основе диагностических сывороток к дезинтегрированным мембранам микроба.

В результате проведённых исследований псевдотуберкулёзный микроб обнаружен бактериологическим методом у 3 телят, а иммунологическими – у 5 животных. Кишечноиерсиниозный микроб выделен от 1 телёнка.

К акту прилагается опись исследованных животных с результатами исследований на 2 листах. Акт составлен в 3 экземплярах.

Подписи:

Ветеринарный врач

ОГУ "Краснопартизанская рай СББЖ"

Доцент ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Аспирант ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Заведующий фермой № 4 СПК "Заря"

Земцов А.С.

Иващенко С.В.

Маниесон В.Э.

Шаяхметов В.Н.  
М.П.



## Список обследованных телят

№ пробы	№ животного	Результат исследований			
		Бактериологический метод		ДИА	ИФА
		Псевдотуберкулезный микроб	Кишечно-иерсиниозный микроб		
1	3780	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
2	3781	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
3	3784	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
4	3792	<b>полож.</b>	отриц.	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>
5	3797	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
6	3800	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
7	3804	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
8	3805	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
9	3808	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
10	3810	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
11	3821	<b>полож.</b>	отриц.	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>
12	3771	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
13	3749	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
14	3748	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
15	3641	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
16	3642	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
17	3708	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
18	3709	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
19	3719	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
20	3721	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
21	3742	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
22	3583	<b>полож.</b>	отриц.	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>
23	3586	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
24	3592	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
25	3597	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
26	3605	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
27	3898	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
28	3894	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.



29	3893	отриц.	<b>полож.</b>	отриц.	отриц.
30	3891	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
31	3834	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
32	3838	отриц.	отриц.	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>
33	3842	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
34	3847	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
35	3609	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
36	3613	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
37	3614	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
38	3515	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
39	3534	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
40	3538	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
41	3962	отриц.	отриц.	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>
42	7389	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
43	7393	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
44	7512	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
45	7385	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
46	7362	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
47	7366	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
48	7372	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
49	7374	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
50	7383	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.

Подписи:

Ветеринарный врач

ОГУ "Краснопартизанская рай СББЖ"

Земцов А.С.

Доцент ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Иващенко С.В.

Аспирант ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Маниесон В.Э.

Заведующий фермой № 4 СПК "Заря"

Шяхметов В.Н.