

На правах рукописи

Кузнецова

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2024

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

- Научный руководитель:** кандидат биологических наук, доцент
Иващенко Сергей Владимирович
- Официальные оппоненты:** **Андреева Альфия Васильевна,**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО "Башкирский государственный аграрный университет",
Профессор кафедры инфекционных болезней,
зоогигиены и ветсанэкспертизы
- Генералов Сергей Вячеславович,**
кандидат биологических наук,
ФКУН "Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека,
ведущий научный сотрудник лаборатории
профилактических иммуноглобулинов
- Ведущая организация:** ФГБОУ ВО "Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана"

Защита диссертации состоится " " 2024 года в ⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.01 при ФГБОУ ВО "Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова" по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

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

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

Автореферат диссертации разослан " " 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время появляется значительное количество сообщений о выделениях *Yersinia pseudotuberculosis* от сельскохозяйственных животных (Martinez P.O. et al., 2009, 2010, 2011; Warth J.F.G. et al., 2012; Jibrin M.S. et al., 2013; Novoslavskij A. et al., 2013; Stanger K.J. et al., 2019). Сельскохозяйственные животные могут являться источниками загрязнения продуктов питания иерсиниями. У людей вспышки псевдотуберкулёзной инфекции происходят достаточно часто и носят массовый характер (Rimhanen-Finne R. et al., 2009; Tseneva G.Y. et al., 2012). 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 (Хаджу А. и др., 2015).

Ассортимент существующих на сегодняшний день псевдотуберкулёзных диагностических препаратов недостаточен и ориентирован на потребности медицины. Коммерческие иммуноферментные диагностические препараты создаются на основе 1 сероварианта микроба (МУК 4.2.3019-12), тогда как у животных наиболее часто встречается 3 серовариант *Y. pseudotuberculosis* (Martinez P.O. et al., 2009, 2010, 2011; Warth J.F.G. et al., 2012; Novoslavskij A. et al., 2013). 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) (Иващенко С.В. и др., 2008). 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 адъювант Фрейнда (ПАФ) (Stills H.F., 2005), но поиски новых результативных и безопасных препаратов активно продолжаются до настоящего времени (Петров Р.В. и др., 2011). Область поиска должна включать также вакцинные адъюванты, ранее не использовавшиеся при получении гипериммунных диагностических сывороток. Одним из таких адъювантов, предложенных для создания вакцин, является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ) (Патент № 2593012 РФ).

Степень разработанности темы исследования

Оценка диагностического значения белков внешней мембраны псевдотуберкулёзного микроба и антител, полученных к ним, проведена в ряде научных работ (Куляшова Л.Б. и др., 1997; Андрюков, Б.Г., 1999; Новикова О.Д. и др., 2014). 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 (Иващенко С.В., 2000). 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 адъюванта впервые был предложен В.М. Скорляковым с соавт. для вакцинации животных (Патент № 2593012 РФ). 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 (Савина С.В. и др., 2016). 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* (Кузнецов М.А. и др., 2017), диметилсульфоксид-антигеном *Y. pseudotuberculosis* (Manieson V.E. et al., 2020).

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* (МУК 4.2.3019-12). 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 адьюванта 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 иммуноферментной тест-системы для ускоренного выявления возбудителя псевдотуберкулёза животных в средах накопления (фосфатно-солевом буфере)" (Иващенко С.В., Кузнецова В.С., 2023); "Инструкция по применению дот-иммунотест-системы для ускоренного выявления возбудителя псевдотуберкулёза животных в средах накопления" (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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

При проведении исследований использовали музейные культуры бактерий: *Y. pseudotuberculosis* O:1, O:3, O:4, O:5 серовариантов, *Y. enterocolitica* O:3, O:9 серовариантов, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, полученные из ГКПМ ФКУН РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора.

В опытах также использовали штаммы бактерий, ранее выделенные от сельскохозяйственных животных: *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта штаммов №13, №40, №67, *Y. enterocolitica* O:3 сероварианта штамма №58, *Klebsiella pneumoniae* K-25.

Для получения бактериальных взвесей культуры энтеропатогенных иерсиний выращивали на мясопептонном агаре 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. Для контроля концентрации взвесей использовали оптический стандарт мутности.

Бактериальную массу двухсуточной агаровой культуры *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта использовали для получения ДМ. Клетки отмывали и разрушали ультразвуком на дезинтеграторе при 22 кГц 8 раз по 60 секунд. Полученные после центрифугирования клеточные стенки растворяли в 2% растворе додецилсульфата натрия. Освобождение ДМ от додецилсульфата натрия проводили диализом в течение 3 суток в дистиллированной воде. Полученные ДМ лиофильно высушивали.

Количество белков измеряли колориметрическим методом (Bradford M.M., 1976). Количество углеводов определяли фенольным методом (Dubois M. et al., 1956). Белковый состав изучали методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli U.K., 1970). Антигенную активность белков устанавливали иммуноблоттингом на нитроцеллюлозной мембране (Towbin H. et al., 1979). 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.

ЛПС получали из "ацетонового порошка" *Y. pseudotuberculosis* O:3 сероварианта. Клетки обрабатывали горячей водно-фенольной смесью без разделения слоёв и осаждали белок трихлоруксусной кислотой (Кульшин В.А. и др., 1987). От фенола и трихлоруксусной кислоты освобождались диализом против дистиллированной воды. Содержащую ЛПС жидкость лиофилизировали.

Определение кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) проводили колориметрическим методом (Konnova S.A. et al., 1994). Определение состава жирных кислот в виде их метиловых эфиров осуществляли с помощью газожидкостной хроматографии (Mayer H. et al., 1985). Определение моносахаридного состава и установление абсолютных конфигураций сахаров проводили методом газожидкостной хроматографии ацетатов полиолов и ацетилированных октил-гликозидов с оптически активным спиртом (R)-2-октанолом (Sawardecker J.S. et al., 1965; Leontein K. et al., 1978). 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.

Для определения оптимальной иммунизирующей дозы вводили внутривенно белым мышам по 0,5 мл антигена (ДМ или ЛПС) в разных дозах. На каждую дозу использовали по 3 мыши. В качестве отрицательного контроля инъецировали фосфатный буферный раствор (ФСБ). Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 10 суток. Через 10 суток после последней иммунизации мышей декапитировали с взятием крови из шейных сосудов, а также с извлечением перитониальных макрофагов и замером их дыхательной активности (Mosmann T., 1983).

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.

Полученные иммунные сыворотки крови исследовали в непрямом варианте ИФА на микропланшетах, производства фирмы "Jet Biofil" (Китай) (Hornbeck P. et al., 2001).

При исследовании экспериментальных сывороток в качестве препаратов сравнения использовали сыворотки кишечной иерсиниозной О:3 серотипа и псевдотуберкулёзную из коммерческих диагностических наборов для РНГА производства ФГУП СПбНИИВС ФМБА России.

ЗНЧ получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия (Frens G., 1973). Размер частиц контролировали по спектрофотометрической калибровке и методом просвечивающей электронной микроскопии. Средний диаметр полученных частиц составлял 15,2 нм. Конъюгацию белка А стафилококка с ЗНЧ проводили методом простой физической адсорбции (Дыкман Л.А. и др., 2008). Изготовленный конъюгат был любезно предоставлен ведущим научным сотрудником лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН (г. Саратов), д. б. н. Дыкманом Л.А.

ДИА с ЗНЧ проводили на нитроцеллюлозной мембране с диаметром пор 0,2 мкм. В центр квадрата площадью 5×5 мм вносили антиген в объёме 4 мкм и подсушивали при 37 °С 45 минут. Блокировали свободные участки на мембране 2%-м бычьим сывороточным альбумином и промывали мембрану в ФСБ. 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 ФСБ с твином-20 (ФСБ-Т). Помещали мембрану в пакет с раствором белка А стафилококка конъюгированного с ЗНЧ. на 6 часов при комнатной температуре. Промывали мембрану в ФСБ-Т. Появление красного цвета у пятен оценивали визуально.

Индикация *Y. pseudotuberculosis* в средах накопления проводилась после их искусственного загрязнения фекалиями свиней, содержащихся в стационаре ФГБОУ ВО Вавиловский университет. Отобранные в момент дефекации свиней фекалии смешивали с ФСБ 1:10 и обсеменяли двухсуточными агаровыми культурами кишечной иерсиниозной и псевдотуберкулёзной микробов из расчёта получения микробной взвеси с содержанием 5×10^6 , 5×10^4 , 5×10^2 , 50 м.к./мл. По 0,5 мл полученных взвесей высевалось в пробирки с 4,5 мл сред накопления: ФСБ и 1% ЗПВ. После этого концентрация иерсиний в средах накопления составляла 5×10^5 , 5×10^3 , 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.

Взятие исследуемого материала у телят, содержащихся в животноводческих хозяйствах Саратовской области, проводилось из прямой кишки 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 (МУК 4.2.3019-12). Высевы с ФСБ осуществляли на 3-и и 6-е сутки бактериологической петлей штрихом на сектора чашки Петри со средой Эндо. Перед посевом пробы подвергались "щелочной обработке" в 0,25%-ом растворе КОН 4 минуты (МУК 4.2.3019-12). 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 производства ФБУН НИИЭМ им. Пастера.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

На первом этапе исследования определили соотношение белков и углеводов в ДМ *Y. pseudotuberculosis*, а также их белковый состав и антигенную активность.

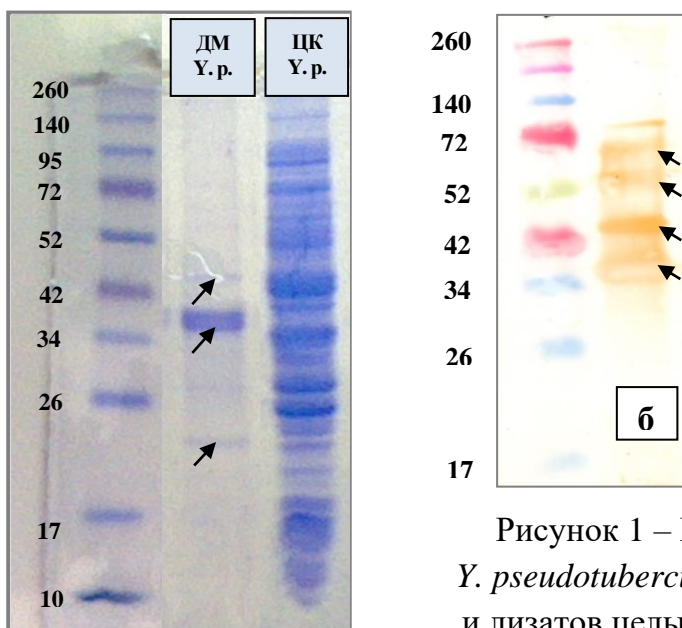


Рисунок 1 – Изучение белкового состава ДМ *Y. pseudotuberculosis*: а – электрофорез белков ДМ и лизатов целых клеток (ЦК); б – иммуноблотинг с сывороткой, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*

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±3,49*10 ⁻¹⁰	1:12800	13,64±0,58
250	11,6±1,37*10 ⁻¹⁰	1:12800	13,64±0,58
125	10,4±2,32*10 ⁻¹⁰	1:6400	12,97±0,33
63	8,7±1,53*10 ⁻¹⁰	1:6400	12,64±0,58
31	5,8±1,48*10 ⁻¹⁰	1:3200	11,31±0,33
16	3,0±0,65*10 ⁻¹⁰	1:1600	10,64
0 (контроль)	1,6±0,41*10 ⁻¹⁰	1:400	8,97±0,33

Таблица 2 – 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

Соотношение белков и углеводов составило 7,5:1, что свидетельствует о явном преобладании белков. 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.

Определение антигенной активности белков ДМ *Y. pseudotuberculosis* нами было проведено на белых мышах с изучением клеточной и гуморальной подсистем иммунитета животных. Для изучения клеточного иммунного ответа мы определяли дыхательную активность перитонеальных макрофагов. Изучение гуморального иммунного ответа проводили наблюдением роста титров специфических антител в крови мышей (Таблица 1).

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 (Шекунова Е.В. и др., 2020).

Для определения масс наиболее активных в антигенном плане белков нами был проведён их иммуноблоттинг с сыворотками крови кроликов, иммунизированных ДМ *Y. pseudotuberculosis* (Рисунок 1б).

Результаты определения специфичности полученной гипериммунной сыворотки представлены в таблице 2.

Сыворотка, полученная к ДМ псевдотуберкулёзного микроба, взаимодействовала в высоких титрах только с клетками *Y. pseudotuberculosis*. С цельными клетками *Y. pseudotuberculosis* её титр составил 1:12800-1:25600, с клетками *Y. enterocolitica* – 1:200, с клетками бактерий других видов – 1:100-1:400 (Таблица 2). 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.

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.

Получение ЛПС проводили методом, исключаящим наличие в препарате белков. Установили, что в нашем образце ЛПС *Y. pseudotuberculosis* содержится 1% КДО. Наличие КДО является качественной реакцией на присутствие в образце ЛПС. Моносахаридный состав и состав жирных кислот исследуемого образца

соответствовал составу ЛПС, полученному из бактерий *Y. pseudotuberculosis* в S-форме.

Для изучения влияния различных доз ЛПС на активность клеточной и гуморальной подсистем иммунитета вводили внутривентриально белым мышам раствор ЛПС в различных дозах (Таблица 3).

Таблица 3 – 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> О:3 / двоичные логарифмы титров антител для n = 3
			титр
125	$1,4 \pm 0,48 * 10^{-10}$	1:3200	$11,97 \pm 0,33$
63	$2,7 \pm 0,27 * 10^{-10}$	1:1600	10,64
31	$16,9 \pm 2,84 * 10^{-10}$	1:1600	$10,97 \pm 0,33$
16	$62,6 \pm 3,38 * 10^{-10}$	1:1600	$10,64 \pm 0,58$
8	$68,5 \pm 4,71 * 10^{-10}$	1:1600	$10,31 \pm 0,33$
4	$19,1 \pm 3,57 * 10^{-10}$	1:800	$9,64 \pm 0,58$
2	$8,4 \pm 1,92 * 10^{-10}$	1:800	$9,31 \pm 0,33$
0 (контрольная)	$1,9 \pm 0,65 * 10^{-10}$	1:400	8,64

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 3).

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 (Шекунова Е.В. и др., 2020).

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.

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 адьювантам.

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 физиологическим раствором (ФР) (Таблица 4).

Таблица 4 – 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 4 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 отмечены очень низкие титры антител, что указывает о стимуляции адьювантами антителогенеза только в сочетании с антигеном. Также использование для иммунизации антигена без адьюванта в группе 3 приводило к значительному снижению титра специфических антител (Таблица 4).

Следует отметить, что использование ПАФ, в отличие от ПААГ, приводило к возникновению в подкожной клетчатке иммунизированных кроликов значительного количества болезненных уплотнений.

Использование ПААГ в качестве адьюванта при иммунизации кроликов ДМ *Y. pseudotuberculosis* позволяло получить гипериммунные сыворотки с видовой специфичностью. Не было отмечено значительных различий специфичности при использовании ПААГ и ПАФ (Таблица 4).

Использование ПААГ в качестве адьюванта для получения гипериммунных сывороток к ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

Результаты изучения динамики синтеза специфических антител в сыворотках крови кроликов, иммунизированных ЛПС *Y. pseudotuberculosis* представлены в таблице 5.

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

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

ПААГ в отличие от ПАФ стимулировал антителогенез. Максимальный титр специфических антител к комплексу ЛПС + ПААГ составил 1:12800 (Таблица 5). Однако для создания псевдотуберкулёзных тест-систем такой относительно невысокий титр специфических антител является недостаточным.

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. 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* (Таблица 8).

Таблица 8 – 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
		Количество бактерий в 1 мл взвеси, выявляемое сывороткой, разведённой 1:200		
Музейных штаммов				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	О:1	10 ⁶	10 ⁸	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	О:3	10 ⁶	10 ⁸	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV	О:4	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> V	О:5	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. enterocolitica</i> 66-82	О:3	–	–	10 ⁸
<i>Y. enterocolitica</i> 383	О:9	–	–	–
Ранее выделенных штаммов				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 13	О:3	10 ⁶	10 ⁸	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 40	О:3	10 ⁶	10 ⁸	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 67	О:3	10 ⁶	10 ⁸	–
<i>Y. enterocolitica</i> 58	О:3	–	–	10 ⁸

Примечание – "–" – отрицательный результат.

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 10⁶-10⁷ м.к./мл взвеси. Гипериммунная сыворотка крови кролика, используемая в данной тест-системе в 16 раз активнее коммерческой псевдотуберкулёзной сыворотки (Таблица 8).

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: 5×10⁵, 5×10³, 50, 5 м.к./мл, а также фекалии свиней. 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 9.

Как видно из таблицы 9, после внесения в среду накопления 5 м.к./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 м.к./мл и выше позволяло обнаруживать

псевдотуберкулёзный микроб в обеих средах уже на 3 сутки "холодового обогащения". Посторонняя микрофлора, находящаяся в свиных фекалиях, препятствия процессу индикации иерсиний данной тест-системой не оказывает.

Таблица 9 – 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 среды, показавшие положительный результат с псевдотуберкулёзными сыворотками (1:200)			
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	5×10^5	1:16	1:64	1:8	1:32
	5×10^3	1:8	1:32	1:4	1:16
	50	1:4	1:16	1:2	1:8
	5	1:2	1:8	–	1:4
<i>Y. enterocolitica</i>	5×10^5	–	1:4	–	–
	5×10^3	–	1:2	–	–
	50	–	–	–	–
	5	–	–	–	–
Контроли	без фекалий*	1:32	1:128	1:8	1:32
	без иерсиний	–	–	–	–

Примечание – "–" – отрицательный результат; * – контроль без фекалий, но с добавлением *Y. pseudotuberculosis* в количестве 5×10^5 м.к./мл среды.

Однако в 1% ЗПВ тест-система обнаруживает помимо псевдотуберкулёзного микроба в незначительной степени *Y. enterocolitica* (Таблица 9). Поэтому в дальнейшем нам придётся отказаться от использования 1% ЗПВ в качестве среды накопления при работе с иммуноферментной тест-системой.

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

На основе гипериммунной сыворотки, полученной после иммунизации кроликов ДМ *Y. pseudotuberculosis* в сочетании с ПААГ, была создана дот-иммунотест-система для поиска антигенов. В качестве индикатора система использовала конъюгат белка А стафилококка с ЗНЧ. Чувствительность и специфичность данной тест-системы изучали на цельных клетках энтеропатогенных иерсиний (Таблица 6).

Таблица 6 – 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	серова-риант	Количество бактерий в 1 мл взвеси, выявляемое сывороткой, разведённой 1:100		
Музейных штаммов				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	О:1	10 ⁸	10 ¹⁰	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	О:3	10 ⁷	10 ¹¹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV	О:4	10 ⁸	10 ¹¹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> V	О:5	10 ⁸	10 ¹¹	–
<i>Y. enterocolitica</i> 66-82	О:3	–	–	10 ¹⁰
<i>Y. enterocolitica</i> 383	О:9	–	–	–
Ранее выделенных штаммов				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 13	О:3	10 ⁷	10 ¹⁰	
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 40	О:3	10 ⁷	10 ¹⁰	
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 67	О:3	10 ⁷	10 ¹⁰	–
<i>Y. enterocolitica</i> 58	О:3	–	–	10 ¹⁰

Примечание – "–" – отрицательный результат.

Тест-система, использующая антитела к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, проявила видовую специфичность. Она выявляла псевдотуберкулёзный микроб в количестве 10⁷-10⁸ м.к./мл, а также в равной степени определяла музейные и выделенные от животных штаммы *Y. pseudotuberculosis*. Аналогичные тест-системы, созданные на основе коммерческих сывороток, проявляли меньшую чувствительность (Таблица 6).

На втором этапе исследований экспериментальной дот-иммунотест-системы, её испытали на возможность индикации энтеропатогенных иерсиний в средах накопления после их "холодового обогащения". Использовали две среды накопления: 1% ЗПВ и ФСБ. В среды предварительно вносили различное количество иерсиний: 5×10⁵, 5×10³, 50 и 5 м.к./мл, а также фекалии свиней. Результаты опыта представлены в таблице 7.

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 м.к./мл; для ФСБ – 5×10³ м.к./мл. Исходное количество иерсиний в фекалиях инфицированных свиней при этом может составлять 5×10² и 5×10⁵ м.к./г

соответственно. Наиболее интенсивно процесс накопления протекал в 1%-й 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 7).

Таблица 7 – 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>	5×10^5	1:10	1:10	цельная среда	цельная среда
	5×10^3	1:10	1:10	цельная среда	цельная среда
	50	цельная среда	1:10	–	цельная среда
	5	цельная среда	1:10	–	–
<i>Y. enterocolitica</i>	5×10^5	–	–	–	–
	5×10^3	–	–	–	–
	50	–	–	–	–
	5	–	–	–	–
Контроли	без фекалий	1:10	1:10	цельная среда	цельная среда
	без иерсиний	–	–	–	–

Примечание – "–" – отрицательный результат.

Следует отметить, что ИФА показал себя более чувствительным методом в сравнении с ДИА, однако он требует наличия специального оборудования для учёта результатов и не всегда доступен для районных ветеринарных лабораторий.

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, Энгельского. 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 10.

Таблица 10 – 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.

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 крупного рогатого скота (КРС) – 2,5%. В общем количестве исследованных животных высеваемость *Y. pseudotuberculosis* составила 1,5%.

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

Все выделенные штаммы иерсиний относятся к О:3 серовариантам.

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 *Y. pseudotuberculosis*.

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

Были проведены исследования фекалий телят бактериологическим и серологическим методами. Серологическое исследование фекалий проводили после их "холодового обогащения" в ФСБ, используя созданные тест-системы.

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

№№ проб	Время обогащения, сутки					
	3			6		
	Выделенный штамм	Серологическое исследование		Выделенный штамм	Серологическое исследование	
		ДИА	ИФА		ДИА	ИФА
4	–	–	0,143	Y.p.	+	0,267
11	Y.p.	+	0,192	Y.p.	+	0,280
22	Y.p.	+	0,220	Y.p.	+	0,310
29	–	–	0,092	Y.e.	–	0,113
32	–	–	0,135	–	+	0,250
41	–	+	0,200	–	+	0,285
1-3, 5-10, 12-21, 23-28, 30, 31, 33-40, 42-50	–	–	0,082- 0,101	–	–	0,089- 0,115

Примечание – "–" – отрицательный результат; "+" – положительный результат; Y.p. – *Y. pseudotuberculosis*; Y.p. – *Y. enterocolitica*.

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, 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.

Заключение

Использование ПААГ в качестве адъюванта позволило получить гипериммунные сыворотки крови кроликов и морских свинок с высоким содержанием антител к ДМ *Y. pseudotuberculosis*.

Создана экспериментальная иммуноферментная тест-система и её дот-вариант с ЗНЧ, которые позволяют успешно определять *Y. pseudotuberculosis* у сельскохозяйственных животных после "холодового обогащения" их фекалий. Данные диагностические препараты позволяют значительно повысить эффективность бактериологического метода.

Выводы

1. Показано, что использование 1%-го раствора полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в сочетании с ДМ *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 работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Изучение антигенных свойств белков дезинтегрированных мембран псевдотуберкулёзного микроба / **В. С. Кузнецова**, С. В. Иващенко, М. Н. Киреев, З. Ю. Хапцев, Т. В. Спиряхина // Вестник КрасГАУ. – 2023. – № 2. – С. 122-128.
2. Псевдотуберкулёзные сыворотки в ДОТ-иммуноанализе с золотыми наночастицами / **В. С. Кузнецова**, С. В. Иващенко, Л. А. Дыкман, М. Н. Киреев, З. Ю. Хапцев // Научная жизнь. – 2023. – Т. 18, № 4 (130). – С. 643-650.

Статьи в изданиях из международной базы данных

3. The effect of synthetic adjuvant on the formation of the immune response / S. V. Savina, S. V. Ivashchenko, V. M. Skornyakov, **V. S. Murtaeva (V. S. Kuznetsova)** // International Research Journal. – 2016. – Vol. 50, N 8, pt. 2. – P. 42-44 (Agris).
4. **Kuznetsova, V. S.** Polyazolidinammonium as an adjuvant in immunization with lipopolysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis* / V. S. Kuznetsova, S. V. Ivaschenko, I. Y. Domnitsky // IOP Conf. Series: Earth and Environ. Sci. – 2020. – Vol. 421. – Article 052022 (Scopus, Web of Science).
5. The effect of polyazolidinammonium on the dynamics of the synthesis of pseudotuberculosis antibodies / S. V. Ivaschenko, **V. S. Kuznetsova**, S. V. Savina, V. M. Skorlyakov // IOP Conf. Series: Earth and Environ. Sci. – 2020. – Vol. 421. – Article 022055 (Scopus, Web of Science).
6. **Kuznetsova, V. S.** Prospects for the use of disintegrated membranes of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica* and specific antibodies derived from them / V. S. Kuznetsova, S. V. Ivaschenko // E3S Web Conf. – 2020. – Vol. 175. – Article 03010 (Scopus).
7. **Kuznetsova, V. S.** Creation of antibody immunoassay test systems for indication of enteropathogenic *Yersinia* / V. S. Kuznetsova, S. V. Ivaschenko // BIO Web Conf. – 2022. – Vol. 43. – Article 03042 (Scopus).

Публикации в сборниках и материалах конференций

8. **Кузнецова, В. С.** Определение иммунизирующей дозы липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* для получения кроличьей гипериммунной сыворотки / В. С. Кузнецова, С. В. Иващенко, А. А. Атапина // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Материалы междунар. науч.-практич. конф. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2019. – С. 52-57.

9. Иващенко, С. В. Выбор адьюванта при получении кроличьей гипериммунной сыворотки к липополисахариду псевдотуберкулёзного микроба / С. В. Иващенко, **В. С. Кузнецова**, А. А. Атапина // Материалы конф. проф.-преподават. состава и аспирантов по итогам науч.-исслед., учебно-методич. и воспитательной работы за 2020 год; ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н. И. Вавилова. – Саратов: ООО "ЦеСАин", 2021. – С. 94-98
10. Иващенко, С. В. Оценка антигенной активности дезинтегрированных мембран иерсиний / С. В. Иващенко, **В. С. Кузнецова**, А. А. Атапина // Материалы конф. проф.-преподават. состава и аспирантов по итогам науч.-исслед., учебно-методич. и воспитательной работы за 2020 год; ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н. И. Вавилова. – Саратов: ООО "ЦеСАин", 2021. – С. 99-104.
11. Возможность использования различных лабораторных животных для получения гипериммунных диагностических сывороток к дезинтегрированным мембранам *Yersinia pseudotuberculosis* / **В. С. Кузнецова**, К. А. Петченко, С. В. Иващенко, О. С. Ларионова // Зыкинские чтения: материалы национальной науч.-практич. конф. посв. памяти д. м. н., проф. Л. Ф. Зыкина. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2022. – С. 118-123.
12. Кузнецова В. С. Влияние иерсиниозных антигенов и адьювантов различной природы на иммунитет кроликов при их гипериммунизации / С. В. Иващенко, **В. С. Кузнецова**, В. Э. Маниесон // Зыкинские чтения: Материалы национальной науч.-практич. конф., посв. памяти д. м. н., проф. Л. Ф. Зыкина. – Саратов: ФГБОУ ВО Вавиловский университет, 2023. – С. 94-98.

Список сокращений, использованных в автореферате

ДИА – дот-иммуноанализ

ДМ – дезинтегрированные мембраны

ЗПВ – забуференная пептонная вода

ЗНЧ – золотые наночастицы

ИФА – иммуноферментный анализ

КДО – кето-3-дезоксиктоновая кислота

КРС – крупный рогатый скот

ЛПС – липополисахарид

м.к./мл – микробных клеток на миллилитр

МФА – метод флуоресцирующих антител

ОРА – ориентировочная реакция агглютинации

ПААГ – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода

ПАФ – полный адьювант Фрейнда

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

ФР – физиологический раствор

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

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

ЦК – целые клетки