

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

На правах рукописи

Venzim.

МАНИЕСОН ВИКТОР ЭММАНУЭЛЬ НИИ ОДОТЕИ НЬОМОДА

**"Создание иммуноферментной тест-системы на основе антител к
диметилсульфоксид-антигену *Yersinia pseudotuberculosis* для индикации
энтеропатогенных иерсиний у сельскохозяйственных животных"**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Саратов – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Распространённость энтеропатогенных иерсиний у животных и людей	11
1.2. Лабораторная диагностика кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза	15
1.3. Антигенная структура возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза	27
1.4. Группы адъювантов, использованных в работе для иммунизации животных	33
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1. Материалы и методы исследований	41
2.2. Результаты исследований и их обсуждение	56
2.2.1. Изучение химических и антигенных свойств диметилсульфоксид-антигена <i>Y. pseudotuberculosis</i>	56
2.2.2. Сравнительная оценка специфической активности диметилсульфоксид-антигенов <i>Y. pseudotuberculosis</i> и <i>Y. enterocolitica</i> и родственных им антител	58
2.2.3. Использование полиазилидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода для иммунизации кроликов диметилсульфоксид-антигеном <i>Y. pseudotuberculosis</i>	62
2.2.4. Использование полиазилидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода для иммунизации морских свинок диметилсульфоксид-	

антигеном <i>Y. pseudotuberculosis</i>	67
2.2.5. Использование золотых наночастиц для иммунизации кроликов диметилсульфоксид-антигеном энтеропатогенных иерсиний	69
2.2.6. Применение антител, полученных к диметилсульфоксид-антигену <i>Y. pseudotuberculosis</i> , для создания иммуноферментной тест-системы	74
2.2.7. Индикация псевдотуберкулёзного и кишечной иерсиниозного микробов бактериологическим методом у сельскохозяйственных животных	78
2.2.8. Испытание созданной иммуноферментной тест-системы на сельскохозяйственных животных	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
ВЫВОДЫ	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	93
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	93
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96
ПРИМЕЧАНИЕ	125

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

В последнее время популярность в качестве адъювантов приобретают синтетические полиэлектролиты. Простота химического синтеза, растворимость в воде, способность образовывать конъюгаты с частицами антигенов, открыли перспективы их использования в качестве адъювантов (Петров Р.В. и др., 2011; Исаенко Е.Ю. и др., 2013). Одним из представителей данной группы химических соединений является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ). Возможность применения ПААГ в качестве адъюванта для получения гипериммунных сывороток крови впервые была изучена при иммунизации кроликов липополисахаридом (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis* (Kuznetsova V.S. et al., 2020), а также дезинтегрированными мембранами *Y. pseudotuberculosis* и *Xanthomonas campestris* (Щербаков А.А. и др., 2017; Ivashchenko S.V. et al., 2020). Данные эксперименты показали перспективность использования ПААГ для гипериммунизаций.

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

Степень разработанности темы исследования

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

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

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

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

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

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

Основные задачи проведённых исследований:

1. Выделить ДМСО-фракцию *Y. pseudotuberculosis* и изучить её антигенные свойства.
2. Получить гипериммунную сыворотку крови к ДА псевдотуберкулёзного микроба и провести оценку её антительной активности и специфичности в сравнении с аналогичной кишечной иерсиниозной сывороткой.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Теоретическое и практическое значение работы. Проведённые исследования дополняют теоретическую базу по изучению полиэлектrolитных адьювантов и бактериальных антигенов. Показана возможность совместного использования ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ для получения диагностических гипериммунных иерсиниозных сывороток. Изучена возможность использования для гипериммунизации кроликов комплекса ДА

Y. enterocolitica и ЗНЧ Созданная иммуноферментная тест-система повышает эффективность диагностики кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза. Разработана инструкция по применению созданной иммуноферментной тест-системы. Результаты диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по дисциплинам "Ветеринарная биотехнология", "Основы иммунологии и получение иммунобиологических препаратов", а также написании дипломных работ в ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Методология и методы исследования. Методологической базой исследований послужили труды отечественных и зарубежных ученых, посвящённые вопросам распространения и лабораторной диагностики кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза, а также создания иммунологических диагностических препаратов для индикации данных инфекций. Научная работа проводилась с использованием комплексного анализа и системного подхода. Автором были применены: теоретико-методологический анализ литературных источников и эмпирические методы исследования. Совокупность использованных методов позволила обеспечить достоверность приведённых в работе выводов и результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

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

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

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

4. Гипериммунные сыворотки, полученные после иммунизации кроликов и морских свинок комплексом ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ, могут быть

использованы в иммуноферментном анализе для индикации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*.

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

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

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

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

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

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Распространённость энтеропатогенных иерсиний у животных и людей

Энтеропатогенные иерсинии (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) относятся к царству *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *γ-proteobacteria*, порядку *Enterobacteriales*, семейству *Yersiniaceae*, роду *Yersinia*. Кроме энтеропатогенных бактерий к роду иерсиний относят возбудителя антропозоонозной чумы - *Y. pestis*, а также ряд непатогенных для млекопитающих видов и *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. similis*, *Y. wautersii* и др. [130, 230, 243, 246, 247, 248] Непатогенные виды иерсиний достаточно часто встречаются в окружающей среде и кишечном содержимом животных и могут затруднять идентификацию энтеропатогенных бактерий.

Энтеропатогенные иерсинии поражают различные виды домашних и диких животных, а также птиц. В публикациях описываются случаи выделения иерсиний от свиней, КРС. овец, коз, кроликов, собак, кошек, обезьян, оленей, косуль, буйволов, кабанов, птиц [19, 42, 67, 91, 116, 186, 188, 189, 192, 193, 233, 239, 240, 244, 249]. Однако наибольший ущерб энтеропатогенные иерсинии наносят свиноводству [89, 116, 150, 181, 186, 188, 190, 191, 192, 225, 233, 237, 238, 240].

Кишечный иерсиниоз, вызываемый *Y. enterocolitica*, протекает у свиней в виде значительных вспышек. Молодняк отъёмного возраста и свиньи, находящиеся на откорме, болеют с признаками диареи, артрита, дерматита и конъюнктивита. Это значительно снижает привесы животных и может привести у них к летальному исходу заболевания. Взрослые свиньи клинически не болеют, но могут служить источниками инфекции для людей и молодых свиней по причине длительного носительства *Y. enterocolitica* в организме [17, 35]. Псевдотуберкулёз возникает у свиней небольшими вспышками в любом возрасте и сопровождается поражением кишечника и лёгких, а в некоторых

случаях сопровождаться гибелью. У части свиней наблюдается латентное течение [17].

Источником заражения свиней кроме больных животных и носителей инфекции, которые выделяют возбудителей с фекалиями, могут быть грызуны [17, 35, 116,] и окружающая среда, в которой при пониженных температурах иерсинии могут размножаться [34, 35].

Регистрация иерсиниозов у свиней проводится не в полной мере. Однако отдельные исследования позволяют выявить заболеваемость кишечным иерсиниозом на территориях с умеренным климатом на уровне 5,8-26,9% [34], а псевдотуберкулёзом - 0,3-18% [240].

Основным материалом для исследования свиней при кишечном иерсиниозе являются миндалины [25, 112, 150, 188, 189, 190, 192, 237, 240] и фекалии [67, 89, 100, 107, 150, 186, 189, 191, 192, 197, 225]. Считается, что в фекалиях иерсинии появляются с 3-х месячного возраста, в 5-ти месячном - выделяются наиболее обильно, а затем количество выделяемых с фекалиями иерсиний постепенно снижается. Обнаруживаемые в фекалиях взрослых свиней иерсинии в большинстве случаев не вирулентны. У взрослых свиней наибольшее количество вирулентных иерсиний находят при убое в миндалинах [188, 225]. Высеваемость иерсиний из миндалин составляет 11-59% [25, 112, 113, 150, 188, 190, 192, 237, 238, 240].

Количество выделенных от свиней вирулентных штаммов *Y. enterocolitica* по отношению к невирулентным может составлять от 44% до 100% [61, 112, 116, 150, 154, 188, 192, 197, 238].

Структура О-антигена энтеропатогенных иерсиний зависит от ареала обитания исследуемых на иерсиниоз животных. В Европе и Южной Америке от свиней преимущественно выделяется О:3 серовариант *Y. enterocolitica* [61, 110, 112, 150, 154, 186, 188, 197, 238], в Африке - О:9 [178], в Азии - О:3 и О:9 [116, 192], в Северной Америке О:3 и О:5 [89]. Основное количество выделений псевдотуберкулёзного микроба от инфицированных свиней приходится на штаммы О:3 сероварианта [186, 188, 233].

Меньший ущерб энтеропатогенные иерсинии наносят КРС, т.к. возникают спорадически. При кишечном иерсиниозе клинические признаки поражения кишечника и лёгких появляются только у молодняка. Для взрослого КРС характерно латентное течение данной инфекции [17, 35]. Псевдотуберкулёз у КРС возникает в любом возрасте с клиническими признаками и гибелью ослабленных животных или латентно [17].

Выделяет КРС энтеропатогенных иерсиний не только с фекалиями, но также с молоком и лёгочной мокротой [17, 35, 42], что увеличивает риск заражения людей. Однако латентное течение кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза у КРС в подавляющем большинстве случаев сопровождается выделением не вирулентных штаммов микробов [61, 107, 193].

Кроме свиноводства энтеропатогенные иерсинии могут наносить значительный экономический ущерб кролиководству и птицеводству в результате массовой гибели разводимых животных и птицы. Поражения кишечника у кроликов вызывает *Y. enterocolitica*, а у птицы - *Y. pseudotuberculosis* [17].

Сведений об возможности возникновения у животных смешанной кишечной иерсиниозной и псевдотуберкулёзной инфекции у животных нет. Однако в литературе встречаются сведения одновременной циркуляции в стаде животных *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* [188, 189, 191], а также других представителей рода *Yersinia* [107, 193, 244] и патогенных представителей других родов кишечной микрофлоры (сальмонелл, кампилобактеров, эшерихий, листерий) [100, 113, 177, 187, 208, 225].

Свиное мясо и больные животные являются основными источниками заражения человека кишечным иерсиниозом [17, 34, 36, 72, 150, 186]. Значительному обсеменению продуктов питания *Y. enterocolitica* способствуют больные грызуны [17, 35, 36, 71] и хранение продуктов при пониженных температурах [17, 25, 35, 36].

Заболеваемость людей кишечным иерсиниозом спорадическая [17, 36, 37]. Однако в Европе по заболеваемости кишечный иерсиниоз занимает 3 место

среди кишечных инфекций [20, 37, 150]. В России учёт заболеваемости ведётся не в полной мере [20, 34]. Основное количество заразившихся людей переносят заболевание латентно. У заболевших с клиническими признаками наблюдают повышение температуры тела, интоксикацию и поражение кишечника с последующим выздоровлением [17, 20, 34, 36, 55]. Основными серовариантами *Y. enterocolitica*, выделяемыми от больных людей, являются O:3, реже O:9 и O:5 [36, 55].

Псевдотуберкулёз у людей может протекать в виде единичных случаев или крупных вспышек. Последние наблюдались преимущественно в северных и восточных регионах РФ [17, 20, 34, 36, 37, 54, 71, 72]. Заболевание сопровождается поражением пищеварительной, дыхательной, двигательной систем органов, а также в некоторых случаях сепсисом и гибелью [17, 20, 34, 36, 54, 55, 71]. Роль сельскохозяйственных животных в заражении псевдотуберкулёзом людей не установлена [36, 71, 72]. Основным заражающим фактором являются грызуны [17, 20, 36, 54, 55, 71, 72] и охлаждённые продукты растительного происхождения [17, 20, 36, 71, 72, 54, 55], имевшие с ними контакт. Если от больных животных выделяют преимущественно O:3 серовариант *Y. pseudotuberculosis*, то 60-90% выделенных от больных людей штаммов данного вида иерсиний представлены O:1 серотипом и только 10-30% и 2-10%, соответственно O:3 и O:4 серотипами [36, 55, 71].

Таким образом, можно констатировать, что кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулёз являются широко распространёнными инфекциями, поражающими животных и людей. Больные животные при кишечном иерсиниозе являются не только причиной экономического ущерба, но также источником инфекции для людей. В стадах больных животных возможна совместная циркуляция *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*.

1.2. Лабораторная диагностика кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза

Лабораторная диагностика кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза в РФ осуществляется с 1988 года согласно нормативным государственным документам. Данные методические указания, рекомендации, правила и ГОСТ издавались Министерствами здравоохранения и сельского хозяйства РФ, а также Роспотребнадзором РФ, в 1988, 1991, 2004, 2005, 2009, 2012, 2013 годах. Действующими в настоящее время являются методические указания 2005 года (для исследования животных, сырья животного происхождения и кормов), 2004, 2009 и 2012 годов (для исследования людей), ГОСТ 2013 года (для исследования пищевых продуктов и кормов на присутствие *Y. enterocolitica*). Схемы лабораторной диагностики представленные в данных документах содержат значительные отличия. Однако все они характеризуются комплексным использованием микроскопического, культурального, биохимического, серологического и генетического методов исследования [11, 14, 34, 35, 36, 37, 71, 72].

Незначительный размер колоний, длительный рост культуры бактерий (2-3 дня), необходимость исследования загрязнённого материала (фекалии, смывы с туш, корма, пищевые продукты) требуют на первом этапе исследования использования жидких сред накопления с селективными свойствами: пептон-сорбит-желчный бульон, иргазан-тикарциллин-лорат калиевый бульон, И-бульон [11, 35, 190]. Однако некоторые схемы исследования, учитывают психрофильность и неприхотливость в питании иерсиниозных бактерий, что позволяет избежать применения в данных схемах селективных добавок и заменить их "холодовым обогащением" на бедных питательных средах: фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), забуференную пептонную воду (ЗПВ), пептонно-калиевую среду. Во время "холодового обогащения" температура культивирования иерсиний снижается с 25-30 °С до 4-8 °С, а время культивирования увеличивается с 1-5 до 3-15 суток [1, 14, 34, 36, 37, 54, 72, 116, 150, 186, 233, 240].

Второй этап бактериологического исследования связан с выделением чистой культуры иерсиний. Для микробов кишечной группы традиционно на данном этапе анализа используются комбинированные плотные питательные среды на чашках Петри, обладающие селективными и дифференциально-диагностическими свойствами (Таблица 1).

Таблица 1 – Комбинированные питательные среды для выделения энтеропатогенных иерсиний [11, 36, 49, 72]

Название среды	Селективные добавки	Дифференциально-диагностически добавки
Цефсулодин-иргазан-новобиоциновый агар	цефсулодин, иргазан, новобиоцин, дезоксихолат натрия, кристаллвиолет	маннит, нейтральный красный
Сальмонелла/шигелла агар с дезоксихолатом натрия и хлоридом кальция	желчные соли, дезоксихолат натрия, тиосульфат натрия, цитрат натрия, бриллиантовый зеленый	лактоза, нейтральный красный, железа (III) цитрат
Среда с бромтимоловым синим	желчь	мочевина, бромтимоловый синий
Среда Серова	желчь, генцианвиолет	мочевина, конго-рот
Иерсиния-агар	желчь, бриллиантовый зеленый	мочевина, бромтимоловый синий
Среда Эндо	фуксин основной	лактоза, фуксин основной, сульфит натрия
Среда Мак-Конки	желчь, дезоксихолат натрия, кристаллвиолет	лактоза, нейтральный красный

За рубежом наибольшее распространение получил цефсулодин-иргазан-новобиоциновый агар, где он используется в комплексе с иргазан-тикарциллин-лорат калиевым бульоном согласно международному стандарту ISO 10273:2003. В РФ в равной степени применяются все выше перечисленные среды [11, 14, 34, 35, 36, 37, 54, 72]. Однако в исследованиях отдельных авторов имеются указания на различия в эффективности комбинированных сред [34].

По мнению некоторых авторов, второй этап бактериальной диагностики можно проводить, минуя первый [34, 36, 112, 238].

Используя свойство устойчивости иерсиний к слабым растворам щелочей, в большинстве схем лабораторных исследований присутствует "щелочная обработка" содержимого сред накопления перед высевом на плотные комбинированные среды. На высокий селективный эффект "щелочной обработки" указывается во многих научных трудах [11, 23, 34, 36, 37, 54, 72, 112, 116, 122, 150, 181, 233, 238, 244].

В своих исследованиях для выделения иерсиний мы последовательно использовали "холодовое обогащение", "щелочную обработку" и рассев на среде Эндо. На агаре Эндо при 26 °С на 2 сутки роста иерсинии образуют мелкие, выпуклые, гладкие, полупрозрачные, с ровным краем колонии. У *Y. enterocolitica* колонии крупнее, чем у *Y. pseudotuberculosis*. Также колонии кишечной иерсинии имеют тёмно-розовый центр и светло-розовый край, а псевдотуберкулёзного – сероватые. Цвет среды вокруг колоний не изменяется, т.к. возбудители не разлагают сахар лактозу. При 37 °С рост энтеропатогенных иерсиний прекращается. При многократных пересевах или в не достаточно благоприятных условиях роста происходит диссоциация колоний на S- и R-формы. Наиболее легко данный процесс происходит у псевдотуберкулёзного микроба. Колонии R-формы имеют вид "яичницы-глазуньи" и не образуют равномерных взвесей в физиологическом растворе [17, 34, 35, 36, 54, 55, 59, 68, 72]. Отбор характерных для иерсиний колоний проводят на скошенные дифференциально-диагностические среды: универсальный скошенный столбик (УСС), среду И.С. Олькеницкого, среду Ресселя I, среду с мочевиной по Кристенсену или уреазы-индол среду. Обязательным условием для таких сред должно быть наличие в их составе мочевины, разложение которой позволяет дифференцировать иерсинии от мочевинонегативных сальмонелл, эшерихий и шигелл [34, 36, 37, 72].

Третий этап бактериологического анализа при диагностике иерсиниозов заключается в идентификации выделенной чистой культуры бактерий. Он

проводится с использованием биохимических, серологических, генетических тестов, а также пробой с диагностическим бактериофагом. Биохимические тесты делятся на 3 группы. К первой группе относятся тесты, которые позволяют определить иерсиний как представителей порядка *Enterobacterales* (например, тест на отсутствие оксидазы) и дифференцировать их от представителей других родов кишечной микрофлоры (Таблица 2).

Таблица 2 – Признаки, дифференцирующие иерсиний от других факультативно-анаэробных грамотрицательных палочек кишечной группы [11, 37, 41]

Тесты	Citrobacter	Edwardsiella	Enterobacter	Escherichia	Hafnia	Klebsiella	Morganella	Proteus	Providencia	Salmonella	Serratia	Shigella	Энтеропатогенные иерсинии
Разложение мочевины	+/-	-	+/-	-	-	+/-	+	+	+/-	-	-	-	+
Разложение лактозы	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-	-
Разложение маннита	+	+/-	+	+/-	+	+	-	-	+/-	+	+	+	+
Разложение цитрата	+	-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+	+/-	-	-
Дезаминирование фенилаланина	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Декарбоксилирование лизина	-	+	+/-	+/-	+	+/-	-	-	-	+	+/-	-	-
Образование H ₂ S	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	-	-
Подвижность при 26 °C	+	+/-	+/-	+/-	+	-	+	+	+/-	+	+/-	-	+

Примечание – (+) – положительный результат; (-) – отрицательный результат; (+/-) – у некоторой части штаммов наблюдается отрицательный результат.

Во вторую и третью группы включены тесты для осуществления внутриродовой дифференциации иерсиний (Таблица 3) и определения

биовариантов внутри вида *Y. enterocolitica* (Таблица 4). Часть признаков иерсиний можно определить на комбинированных дифференциально-диагностических средах (УСС, средах Олькеницкого, Ресселя I и II). Эти среды позволяют оценить реакцию иерсиний на присутствие в среде мочевины, глюкозы, лактозы, сахарозы, маннита, способность к продукции сероводорода.

Таблица 3 – Признаки, дифференцирующие иерсиний внутри рода [37, 11]

Тесты	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. rohdei</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. bercovieri</i>
Разложение мочевины	-	+	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
Разложение цитрата	-	-	-	+/-	+	-	+	+	-	-	-
Разложение сахарозы	-	-	+/-	+	+	-	-	+/-	+	+	+
Разложение рамнозы	-	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Разложение раффинозы	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
Разложение мелибиозы	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
Декарбоксилирование орнитина	-	-	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Реакция Фогеса-Проскауэра при 26 °С	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-

Примечание – (+) – положительный результат; (-) – отрицательный результат (+/-) – у некоторой части штаммов наблюдается отрицательный результат.

Однако остальные биохимических признаки определяют на соответствующих питательных средах, например, для тестов на рамнозу, раффинозу, мелибиозу, сорбитол, салицин, ксилозу используют среды Гисса, для реакции Фогеса-Проскауэра среду Кларка, для разложение цитрата среду Симмонса, для

индикации орнитиндекарбоксилазы среду Биргера-Крушинской и т.п. [11, 14, 34, 35, 36, 37, 72]. Большое количество биохимических признаков можно определять с помощью биохимических тест-систем на микропланшетах [63].

Таблица 4 – Биохимические свойства энтеропатогенных иерсиний [11, 37]

Признак	Биоварианты <i>Y. enterocolitica</i>					
	1А	1Б	2	3	4	5
Разложение трегалозы	+	+	+	+	+	–
Разложение сорбитола	+	+	+	+	+	–
Разложение ксилозы	+	+	+	+	–	+/-
Разложение салицина	+	–	–	–	–	–
Разложение эскулина	+	–	–	–	–	–
Липазная активность (РазложениеТвина-80)	+	+	–	–	–	–
Нитратредуктазная активность	+	+	+	+	+	–
Дезоксиноклеазная активность	–	–	–	–	+	+
Пиразиnamидазная активность	+	–	–	–	–	–
Образование индола	+	+	+/-	–	–	–

Примечание – (+) – положительный результат; (–) – отрицательный результат (+/-) – у некоторой части штаммов наблюдается отрицательный результат.

Обязательной процедурой перед изучением биохимических тестов является световая микроскопия выделенных бактерий, окрашенных методом Грама. Энтеропатогенные иерсинии имеют вид мелких, коротких, грамотрицательных, одиночно расположенных палочек, часто с биполярной окраской [14, 34, 35, 36, 37, 72].

Одновременно с изучением биохимических свойств выделенных бактерий проводят оценку их подвижности при 26 °С. Данный тест позволяет отличить иерсиний от неподвижных клебсиелл [14, 34, 35, 36, 37, 72].

В некоторых случаях с целью повышения достоверности результатов идентификации *Y. pseudotuberculosis* может быть поставлен тест с диагностическим псевдотуберкулёзным бактериофагом [37, 54, 71, 72] или ориентировочную реакцию агглютинации на стекле (ОРА) с диагностическими псевдотуберкулёзными поливалентными лошадиными иммуноглобулинами [37, 72]. Оба препарата производятся ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора.

Дополнительными тестами, позволяющими дать более полную оценку свойствам выделенных иерсиний, являются серотипирование [11, 34, 36, 37, 71, 72] и проверка устойчивости к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом [37, 71]. Для серотипирования иерсиний в нашей стране ФБУН НИИЭМ им. Пастера выпускает диагностические О-моновалентные кроличьих сухие агглютинирующие сыворотки для ОРА к серовариантам *Y. enterocolitica* O:3; O:5; O:5,27; O:6,30; O:6,31; O:7,8; O:9; O:13,7 и *Y. pseudotuberculosis* O:1; O:3 [34]. Зарубежные фирмы производят аналогичные препараты для серотипирования иерсиний [91, 233]. Всего по О-антигену известен 21 серотип *Y. pseudotuberculosis* (O:1a; O:1в; O:1с; O:2a; O:2в; O:2с; O:3; O:4a; O:4в; O:5a; O:5в; O:6; O:7; O:8; O:9; O:10; O:11; O:12; O:13; O:14; O:15) и 30 серотипов *Y. enterocolitica* (O:1,2,3; O:2,3; O:3; O:4; O:5; O:5,27; O:6,30; O:6,31; O:7,8; O:8; O:9; O:10; O:13; O:13,7; O:14; O:16; O:18; O:19,8; O:20; O:21; O:22; O:36; O:41,42; O:41,43; O:46; O:63; O:64; O:65; O:66; O:72) [36, 37, 54, 234]. Некоторые авторы указывают на наличие 60 О-сероваров кишечной иерсиниозного микроба [17, 68]. Однако не все сероварианты иерсиний в равной степени вирулентны для человека и животных [17, 36, 37, 54, 68].

Четвёртым, завершающим этапом бактериологической диагностики иерсиниоза является определение вирулентности бактерий. Подходы к определению вирулентности энтеропатогенных иерсиний могут быть различными. Наиболее простым и распространённым тестом на вирулентность является ОРА с сывороткой к вирулентным иерсиниям (СВИ), производства

ФБУН НИИЭМ им. Пастера. Данная сыворотка содержит антитела к V и W антигенам вирулентности, имеющих плазмидное происхождение [34, 35, 36, 37]. Для более надёжного определения вирулентных свойств у иерсиний следует серологический тест дополнять фенотипическим анализом вирулентности в тестах аутоагглютинации, кальцийзависимости роста, температурозависимой морфологии колоний [34, 36, 37, 72]. На отсутствие вирулентности у *Y. enterocolitica* также указывает принадлежность выделенной культуры бактерий к 1А биоварианту. Представители данного биоварианта разрушают салицин и эскулина, обладают пиразинамидазной активностью [11, 36, 37, 244] и принадлежат к следующим серовариантам: O:5; O:6,30; O:6.31; O:7,8; O:10; O:13,7; O:14; O:16; O:19,8; O:22; O:36; O:41,42; O:41,43; O:46; O:63; O:64; O:65; O:66; O:72 [37, 36]. В редких случаях определение вирулентности осуществляют путём перорального [37, 54] и внутрибрюшинного заражения белых мышей [54], а также пероральной [72] и кератоконъюнктивальной проб на морских свинках [37, 54, 72].

При наличии в лаборатории оборудования для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) на нём можно осуществлять идентификацию энтеропатогенных иерсиний [35, 37] и выявлять гены ответственные за вирулентность бактерий: гены инвазии и адгезии – *inv*, *ail* [34, 36, 37]; гены токсинов – *ystA*, *yptA*, *yptB*, *yptC* [34, 36, 37]; гены плазмиды вирулентности иерсиний – *yopB*, *yopH*, *virF*, *yadA* [34, 36, 37]. Также можно непосредственно выявлять плазмиду патогенности pYV 45 МДа [37] или плазмиду pVM 82 МДа [36, 37]. Вторая плаزمида встречается только у *Y. pseudotuberculosis* O:1 и определяет наиболее тяжёлое протекание инфекции.

Помимо бактериологического метода присутствие иерсиний в исследуемом материале позволяют выявлять иммунологические методы. В действующих методических указаниях утверждённых в 2004, 2009, 2012 годах для индикации антигенов предлагается использовать иммуноферментный анализ (ИФА) [34, 36, 37], реакцию коаггутинации (РКоА) и реакцию латексной агглютинации (РЛА) [34, 36]. В более раннем документе 1990 года

наряду с ИФА и РКоА предусматривается применение непрямого варианта метода флуоресцирующих антител (нМФА) [72]. Однако в настоящее время из отечественных коммерческих антительных диагностических препаратов можно приобрести иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные адсорбированные лошадиные, сухие, пр-ва ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора [57] и ПСЕВЛАТ – диагностикум латексный для выявления *Yersinia pseudotuberculosis* иммуноглобулиновый, жидкий, пр-ва ФГУП СПБНИИВС ФМБА РФ [34]. До недавнего времени ФБУН НИИЭМ им. Пастера производил тест-систему иммуноферментную для выявления антигенов иерсиний псевдотуберкулеза I серовара [34]. Как видно из перечня перечисленных препаратов, в РФ не выпускаются коммерческие препараты для индикации *Y. enterocolitica* в материале от больных животных и людей. Кроме того, действующие МУ от 2005 года и ГОСТ ISO 10273-2013 вообще не предусматривают применение иммунологических методов в диагностике иерсиниозов за исключением ОРА для определения вирулентности или серотипирования [11, 35]. Такое недостаточное внимание к иммунологическим методам при индикации иерсиниозных антигенов объясняется приоритетностью генетических исследований, которые присутствуют во всех официальных действующих МУ за исключением ГОСТ ISO 10273-2013.

Обнаружение антител к энтеропатогенным иерсиниям у животных и людей применяется чаще, чем индикация антигенов. Для этого исследуют парные сыворотки крови в реакции агглютинации (РА) [34, 36, 37, 71, 72], реакцию не прямой гемагглютинации (РНГА) [34, 36, 37, 71, 72], ИФА [36, 37]. РНГА и ИФА достаточно хорошо обеспечены коммерческими диагностическими препаратами. ФГУП СПБНИИВС ФМБА РФ выпускает три эритроцитарных диагностикума: 1) БЕРЛЕЗ® диагностикум эритроцитарный псевдотуберкулезный антигенный для РНГА, сухой [34, 57]; 2) диагностикум эритроцитарный кишечной иерсиниозный О3 антигенный, сухой; 3) диагностикум эритроцитарный кишечной иерсиниозный О9 антигенный, сухой

[34, 57]. Российское предприятие ООО "Омникс" производит целый ряд иммуноферментных тест-систем для выявления отдельных классов иммуноглобулинов специфичных энтеропатогенным иерсиниям: тест-системы "Иерсиниоз-ИФА-IgA", "Иерсиниоз-ИФА-IgM" и "Иерсиниоз-ИФА-IgG". Однако коммерческого антигена для РА в настоящее время не производится, что затрудняет постановку данной реакции. Кроме отечественных препаратов на Российском рынке можно приобрести импортные иммуноферментные тест системы, например, Anti-Yersinia-enterocolitica ELISA (IgA, IgG), EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG.

Все используемые в диагностике иерсиниозов иммунологические реакции имеют свои преимущества и недостатки. К примеру, РКoA, РЛА, МФА, РА, РНГА в отличии от ИФА характеризуются простотой исследования. При этом РКoA, РЛА, МФА, ИФА отличаются быстротой проведения теста. Для РЛА, МФА, РНГА, ИФА свойственна более высокая специфичность по сравнению с РА и РКoA. Наиболее высокая чувствительность наблюдается у ИФА, а низкая – у РА. Высокочувствительные тесты позволяют выявлять бактерий и антитела на более ранних сроках заболевания [5, 17, 27, 54, 68, 70]. Однако РА превосходит РНГА при определении серологических сдвигов [13, 70]. К существенным недостатком РА следует отнести необходимость наличия в лаборатории эталонных культур иерсиний, а к недостаткам МФА – низкую информативность и производительность. МФА и ИФА требуют наличия специального оборудования [17, 54, 68]. Эффективность у выше перечисленных иммунологических тестов зависит не только от вида реакции, но также во многом определяется качеством используемого в диагностике антигена или антитела, а также качеству подготовки исследуемого образца. [13, 17, 20, 54, 68, 101, 213] Значительно улучшить эффективность иммунологических методов позволяет подращивание микрофлоры в течение 2-3 суток после посева исследуемого материала на жидкие среды накопления [17].

Наиболее часто используемым иммунологическим методом диагностики иерсиниозов за рубежом является ИФА для обнаружения антител [82, 86, 106,

134, 174, 189, 195, 198, 213, 249]. Его можно использовать в сочетании с ПЦР. В данном случае ИФА служит индикатором наличия специфических антител в крови или тканях животного, а ПЦР позволяет обнаружить ДНК возбудителей инфекций в лимфоузлах или фекалиях с одновременным определением степени вирулентности бактерий [189]. Редко ИФА применяют для выявления антигенов в поражённых тканях [123, 211]. Наиболее распространённым является твёрдофазный ИФА на планшетах. Такой вид ИФА может быть использован в трёх модификациях: прямой, непрямой и конкурентной. Для непрямого метода характерным является использование антивидового пероксидазного конъюгата, а для прямого и конкурентного методов – специфического пероксидазного конъюгата. Преимуществом антивидового конъюгата является его универсальность, т.е. возможность применения при разных заболеваниях в сочетании с не меченой ферментом специфической сывороткой. Это особенно удобно при небольших объёмах исследований или при одновременной индикации нескольких возбудителей. В лабораториях для индикации антител используют непрямой и конкурентный варианты, а для обнаружения антигена – прямой и непрямой. В последнем варианте ИФА (непрямом для обнаружения антигена) необходимо помимо антивидового конъюгата наличие двух специфических иерсиниозных сывороток от разных видов животных [64].

Кроме коммерческих иммуноферментных тест-систем в России и за её рубежами создавались экспериментальные образцы. Часто их специфичность, чувствительность и эффективность превышали коммерческие аналоги. В качестве антигенов такие тест-системы использовали цельные клетки [134], различные белки [86, 106, 157, 196, 198, 213], ЛПС [106, 134, 174, 196, 211] и углеводы [195], а в качестве антительной составляющей – иммуноглобулины из адсорбированных поликлональных [211] и моноклональных [123, 157] сывороток. Моноклональные сыворотки значительно повышали специфичность иммуноферментных тест систем, но приводили к их удорожанию. Для получения адсорбированных поликлональных сывороток и выделенных из них

иммуноглобулинов проводят иммунизацию животных цельными клетками, клеточными мембранами, белковыми фракциями, отдельными белками, белково-полисахаридными субстанциями и ЛПС. Чувствительность экспериментальных антительных иммуноферментных тест-систем колебалась в пределах 5×10^4 - $5,8 \times 10^6$ м.к./мл, эффективность – 82-100%, специфичность – 93-96% [4, 30, 31, 33, 54, 68, 211]. По оценкам российских и зарубежных учёных эффективность ИФА при иерсиниозах на 33-83% превышает эффективность бактериологического метода [198], что предполагает использование ИФА в бактериологической диагностике с целью повышения эффективности последней.

Как отмечалось выше, достаточно широко в диагностике иерсиниозов используется генетический метод. Ему отдаётся приоритет при экспресс-обнаружении иерсиний в материале от больных животных и людей, однако следует учитывать, что проведение ПЦР в большинстве районных ветеринарных лабораторий невозможно из-за отсутствия необходимого дорогостоящего оборудования.

Для индикации энтеропатогенных иерсиний при помощи ПЦР используют праймеры к хромосомным (*ail*, *inv*, *ystA*, *ystB*, *foxA*, *rfbC*, *per*, *16S rRNA*, *ypmA*, *ypmB*, *ypmC*, *rp1*, *irp2*, *PSN*, *ybtE*, *ybtP-ybtQ*, *ybtX-ybtS*, *IS100*) [89, 91, 112, 116, 150, 186, 188, 189, 192, 233, 237, 244] и плазмидным (*virF*, *yadA*, *yopB*, *yopH*, *yopT*, *lcrF*) [112, 116, 150, 186, 188, 192, 233, 239] генам. Они могут определять одновременно два вида энтеропатогенных иерсиний (*16S rRNA*, *virF*, *yopB*, *yopH*, *yopT*, *lcrF*) [112, 116, 150, 186, 188, 192, 233, 239] или только один вид. Например, возбудителя кишечного иерсиниоза можно выявлять при помощи *ail*, *ystA* и *ystB*, *foxA*, *rfbC*, *per*, *yadA*, а псевдотуберкулёзного микроба – *inv*, *ypmA*, *ypmB*, *ypmC*, *irp1*, *irp2*, *PSN*, *ybtE*, *ybtP-ybtQ*, *ybtX-ybtS*, *IS100* [89, 91, 112, 116, 150, 186, 188, 189, 192, 233, 237, 244]. Также проведением ПЦР можно установить серовариант иерсинии или вирулентность. Например, *Y. enterocolitica* O:3 сероварианта имеет положительный тест на присутствие *rfbC* гена, а O:9 сероварианта – гена *per*

[150]. Вирулентные штаммы иерсиний должны содержать один или несколько генов ответственных за факторы патогенности. К таким генам относятся: *ail*, *inv*, *ystA*, *ypmA*, *ypmB*, *ypmC*, *irp1*, *irp2*, *yopB*, *yopH*, *yopT*, *lcrF*, *virF*, *yadA*.

1.3. Антигенная структура возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза

У энтеропатогенных иерсиний имеются антигены белковой и липополисахаридной природы, а также поверхностные структуры с антигенными свойствами. ЛПС и некоторые белки встречаются у обеих энтеропатогенных иерсиний, например, белок инвазин, белок *YadA*, липопропротеин *YlpA*, белки *Yop* и белки-порины. Другие белки могут принадлежать только *Y. pseudotuberculosis* или *Y. enterocolitica*. На основе многих антигенов могут быть созданы диагностические препараты, поэтому важно знать строение и свойства данных структур [20, 54, 59, 136].

Белковые антигены

Белок *YadA* массой 45 кДа располагается на фибриллах энтеропатогенных иерсиний. Белок обладает адгезивной, инвазивной и защитной функциями. Его отсутствие у кишечной иерсиниозного микроба приводит к снижению вирулентности. Синтез белка происходит при 37 °С с участием плазмидной ДНК [92, 180].

Липопропротеин *YlpA* с белковой составляющей массой 24 кДа находится в наружной мембране и выполняет защитную функцию. Образуется белок при температуре 37 °С. Его ген имеет плазмидную локализацию [104].

Белки наружной мембраны энтеропатогенных иерсиний (*Yop*) являются важными факторами патогенности и синтезируются при температуре 37 °С при участии плазмиды *pYV*. Они родоспецифичны. Известно 12 *Yop* белков: *YpkA*, *YopE*, *YopH*, *YopJ*, *YopM*, *YopT*, *YopB*, *YopD*, *YopN*, *YopR*, *YopK* и *LcrV*.

Белок *YpkA* с массой 82 кДа разрушает мембраны эукариотических клеток.

Цитотоксин YopE с молекулярной массой 23 кДа разрушает актиновые волокна клеток макроорганизма [124, 200].

Белок YopH с массой 51 кДа препятствует тирозинфосфорилированию протеинов, затрудняя фагоцитоз [124, 250].

YopJ снижает воспалительную реакцию и препятствует фагоцитозу. Белок имеет массу 33 кДа [93].

Белок YopM с массой 42 кДа тормозит активацию тромбоцитов [216].

YopT является белком-цитотоксином с массой 36 кДа [152].

Белки YopB (42 кДа) и YopD (33 кДа) формируют поры в клеточной мембране эукариот для проникновения внутрь клеток других Yops [129].

Белок LcrV (V-антиген) с массой 37 кДа помогает белкам YopB и YopD [129].

YopR с массой 18 кДа значительно усиливает вирулентность иерсиний.

Белок YopN с массой 33 кДа способствует межклеточному транспорту Yop [129].

YopK (21 кДа) наоборот, снижает интенсивность перехода Yop в эукариотическую клетку [77].

В энтеропатогенных иерсиниях синтезируется 6 белков, помогающих Yops, т.н. шаперонов: SycA, SycD, SycE, SycH, SycN, SycT [81, 99, 152, 245]. В клетке также присутствуют белки-регуляторы взаимоотношений Yop-Syc: TyeA, LcrG, LcrQ [164, 214].

Белки-порины бывают родо- и видоспецифическими. Их масса и состав могут различаться у разных видов иерсиний. Порины образуют каналы в клеточной стенке иерсиний. Они могут синтезироваться в широком диапазоне температур, однако температура культивирования бактерий существенно влияет на состав поринов. Они не являются факторами патогенности и не токсичны [52].

Белок инвазин с молекулярной массой 100-103 кДа содержится в клеточной стенке энтеропатогенных иерсиний при температуре 28-30 °С. Он служит бактериям для прикрепления к клеткам макроорганизма и

проникновению внутрь них. Инвазин является важным фактором патогенности и кодируется хромосомным геном *inv*. Различия его у *Y. pseudotuberculosis* или *Y. enterocolitica* составляют 27% [204].

Энтеропатогенными иерсиниями во внешнюю среду выделяется термостабильный энтеротоксин белковой природы. Масса его у *Y. pseudotuberculosis* составляет 45 кДа, а у *Y. enterocolitica* – 12,4 кДа. Кодируется токсин на нуклеоиде и выделяется иерсиниями при пониженных температурах [20, 69, 203].

Белок Ail с массой 17 кДа находится на поверхности *Y. enterocolitica* и обеспечивает адгезию и инвазию бактерий. Синтез его слабо связан с окружающей температурой, но требует присутствия хромосомного гена *ail*. [179].

Белок MyfA с молекулярной массой 21 кДа образует фимбрии у кишечной иерсиниозного микроба. Данный белок хромосомного гена синтезируется при температуре 37 °С и является важным фактором патогенности, отвечая за адгезию иерсиний [20, 227].

Антиген рН 6 находится на фимбриях адгезии *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Синтезируется он с хромосомного гена при 37 °С и низком значении рН.

Y. pseudotuberculosis в клеточной стенке содержит суперантиген YPM, вызывающий неспецифическую активацию клеточного иммунитета, шок и повреждение тканей. Этот белок кодируется хромосомой, максимально синтезируется при 28 °С и бывает 3-х типов: А, В, С [117, 228].

В нашей научной работе представлен материал по извлечению иерсиниозных антигенов при помощи ДМСО, поэтому мы считаем целесообразным включить в литературный обзор информацию по свойствам и использованию данного соединения.

Молекула ДМСО имеет химическую формулу $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, и расположение в виде пирамиды с атомом серы на вершине. Вещество является биполярным протофильным апротонным растворителем, способным растворять

гидрофильные и гидрофобные соединения. Оно бесцветно, имеет жидкую густую консистенцию и слабый характерный запах. Легко образует смеси с водой, органическими растворителями и ненасыщенными углеводородами. Коммерческий препарат ДМСО содержит 99,5% вещества.

ДМСО широко применяется в химическом производстве и медицине [29]. ДМСО слаботоксичен [111, 201, 212]. При приготовлении лекарств ДМСО используют в качестве растворителя или самостоятельного лекарственного средства для лечения мочеполовой системы [147, 212], опорно-двигательной [111, 147], нервной [111, 147, 155], сердечно-сосудистой [155], а также кожных [111] и онкологических заболеваниях [147] и др. Установлено, что ДМСО обладает иммуномодулирующим действием [147] и увеличивает титры специфических антител [101, 119].

Механизм действия высоких концентраций ДМСО на клетку связан с разрушением липидного слоя клеточной стенки [135]. Было установлено, что из препарата клеточных стенок бактерий кишечной группы ДМСО извлекает преимущественно ЛПС, а из не разрушенных клеток – белки. В последнем случае соотношение белок-ЛПС составит 54:1. Общий выход белка зависит от вида микроба и составляет в среднем 13-19% от клеточной массы [78].

При высокой концентрации в растворах ДМСО разворачивает гидрофобные концы белковых молекул, присоединяясь к ним, что увеличивает растворимость данных комплексов [83].

С использованием ДМСО получали антигены из возбудителя туберкулёза человека, а также с поверхности фибробластов куриных эмбрионов. В обоих случаях выделенные вещества оказались гликопротеинами. Туберкулёзные антигены взаимодействовали с сыворотками больных людей, антигены фибробластов были успешно использованы для иммунизации кроликов с целью получения специфических антител [62, 159].

Полисахаридные антигены

Полисахаридные антигены клеточной стенки энтеропатогенных иерсиний представлены общим антигеном энтеробактерий (ЕСА) и ЛПС.

ЛПС присутствует в клеточной стенке обеих энтеропатогенных иерсиний. Он состоит из полисахаридной боковой цепи, полисахаридного ядра (кора) и липида А [218].

Полисахаридная боковая цепь (О-цепь) иерсиний выступает за пределы клеточной поверхности, содержит до 26 олигосахаридных остатков, часто имеет разветвлённый вид. Она состоит из повторяющихся звеньев, каждое из которых включает в себя от 4 до 8 олигосахаридов. Например, у псевдотуберкулёзного микроба IA сероварианта в звене присутствуют: паратоза, 6-дезоксигептоза, D-галактоза и D-N-ацетилглюкозамина, а III сероварианта: паратоза, D-манноза, L-фукоза, D-N-ацетилгалактозамин. Олигонуклеотидный состав, последовательность расположения, разветвлённость, наличие кольцевых форм и тип связи между сахарами в полисахаридной цепи зависят от вида и сероварианта иерсинии. Это позволяет использовать полисахаридную цепь в качестве специфической составляющей при иммунизации животных или при создании диагностических препаратов. Также установлена способность О-цепи вызывать синтез антител, поэтому её можно назвать О-антигеном. О-цепь *Y. pseudotuberculosis* содержит 22 антигенных центра, большая часть которых располагается на разветвлённых её концах. Антигенные центры позволяют бактерии связываться с антителами. R-формы иерсиний не имеют полисахаридной боковой цепи и не могут быть использованы в качестве источника О-антигена [15, 40, 88, 218].

Ближе к клеточной стенке бактерий располагается полисахаридный кор, который состоит из внешней области, соединённой с О-цепью, и внутренней - граничащей с липидом А. Внешняя область кора является олигосахаридом, который у *Y. pseudotuberculosis* разветвлён и состоит из глюкозы и галактозы. Внутренняя область представлена молекулами L-глицеро-D-манногептозы и 2-

кето-3-дезоксооктоновой кислоты (КДО). Такое строение внутренней области кора характерно для всех грамотрицательных бактерий [88, 218].

Антитела, полученные к целому кору иерсиний или его внутренней части взаимодействуют с другими грамотрицательными бактериями [73, 88, 114, 185, 218].

Все сероварианты *Y. pseudotuberculosis* содержат липид А сходной структуры, основой которого является дисахарид – β -1,6-глюкозаминобиоза, присоединённый к КДО гликозидной связью. Дисахарид несёт два остатка фосфорной кислоты в положениях 1 и 4', а также насыщенные жирные кислоты, ориентированные к фосфолипидному слою. Аминогруппа глюкозамина присоединяет одну молекулу 3-гидрокситетрадекановой жирной кислоты, а по месту некоторых гидроксильных групп присоединяются остатки 3-гидрокситетрадекановой и додекановой жирных кислот [40, 88, 103, 166, 218].

О-цепь экранирует активные центры липида А, затрудняя выработку антител. После удаления полисахаридных цепей открывается доступ к 3 активным центрам липида А, что приводит к синтезу антител, способных связываться с большинством грамотрицательных бактерий. Однако мыши и морские свинки не продуцируют антитела к липиду А [88, 103, 144].

При иммунизации животных ЛПС необходимо учитывать токсичность липида А, особенно при введении полного ЛПС, т.к. полисахаридная часть ЛПС усиливает токсичность липида А [88].

При введении небольших количеств ЛПС в смеси с другими антигенами он оказывает адьювантный эффект, который достигается за счёт активизации фагоцитоза, а также активации и дифференцировки В-клеток [80, 88, 156].

Кроме ЛПС у всех энтеробактерий в клеточной стенке содержится полисахаридный нетоксичный общий антиген энтеробактерий (ЕСА). Он состоит из нескольких повторяющихся участков, содержащих 4-ацетамидо-4,6-дидезокси-D-галактозу, N-ацетил-маннозаминуруновую кислоту и N-ацетил-глюкозамин. Максимальный синтез ЕСА происходит при 22 °С. Антиген может находиться в периплазматическом пространстве или на поверхности клеточной

стенки, где соединяется с липидами. Синтез антител происходит только при соединении ЕСА с белками или ЛПС [102, 160, 205].

Антигены поверхностных структур

Псевдотуберкулёзный микроб в отличие от кишечной иерсиниозной образует небольшую капсулу. Пониженные температуры стимулируют синтез капсульного вещества. Вещество капсулы не удаляется при центрифугировании, а также обладает токсичностью и антигенными свойствами. Форма токсичного воздействия капсульного вещества сходна с таковой у ЛПС. Протеингликолипидный антиген капсулы имеет общие детерминанты с капсульным антигеном возбудителя чумы [21, 59].

Обе энтеропатогенные иерсинии являются перитрихами. Подвижность у них проявляется при температурах ниже 30 °С. При культивировании иерсиний при 37 °С с каждым пассажем количество жгутиков уменьшается. В составе жгутиков имеется белковый Н-антиген, который сходен у всех иерсиний и диагностического значения не имеет [59].

1.4. Группы адъювантов, использованных в работе для иммунизации животных

Для неспецифического усиления антигенного воздействия на иммунную систему используют адъюванты, которые могут усиливать гуморальный или клеточный иммунитеты. Наиболее востребованными являются адъюванты, вызывающие сбалансированный иммунный ответ, сопровождающийся синтезом антител и активизацией лимфоцитов.

По физико-химической природе адъюванты делят на несколько групп.

1. Минеральные адъюванты. Наиболее востребованными в этой группе являются соединения алюминия: гидроксида алюминия, фосфата алюминия и алюмокалиевые квасцы. Первые два вещества плохо растворяются в воде и представляют собой коллоиды. Алюмокалиевые квасцы, напротив, используют в виде раствора. Соединения алюминия создают "депо" антигена в месте

введения, стимулируют умеренную воспалительную реакцию и запускают процессы синтеза антител. Основными недостатками данных адъювантов являются несбалансированный гуморальный иммунитет и невозможность использования их для гипериммунизаций в связи с отсутствием стимулирующего действия при повторных введениях. Также некоторыми исследователями указывается неблагоприятное воздействие гидроксида алюминия на нервную систему при его многократном использовании. Однако, несмотря на все свои недостатки гидроксид алюминия официально разрешён для вакцинации человека и является наиболее распространённым адъювантом.

2. Масляные адъюванты смешиваются с водными растворами 1:1, создавая масляную эмульсию, для стабилизации которой в адъюванте присутствует поверхностно-активное вещество (Tween или Span). Масляные адъюванты вызывают сильное воспаление в месте введения, длительно депонируют антиген и стимулируют антителогенез. Для сбалансированного иммунитета масляные адъюванты необходимо комбинировать с другими иммуностимуляторами. Данная группа адъювантов широко используется при вакцинациях и гипериммунизациях. Существует целый ряд масляных коммерческих иммуностимулирующих препаратов.

Наиболее известным и эффективным масляным адъювантом является полный адъювант Фрейнда (ПАФ). Дополнительным компонентом которого являются убитые микобактерии туберкулёза, отвечающие за клеточную составляющую иммунитета. Адъювант вызывает сильное повреждение тканей в месте инъекции и аллергическую реакцию замедленного типа, что ограничивает его использование однократным введением при гипериммунизациях животных. Однако создаваемый ПАФ иммунитет по сбалансированности и силе ответа является эталонным, если сравнивать его с эффектом от других адъювантов. Менее эффективным является неполный адъювант Фрейнда (НАФ). Из-за отсутствия в нём микробных клеток иммунитет создаётся несбалансированным, а антителогенез менее выраженным. Однако умеренное местное воздействие на ткани организма

позволяет использовать НАФ многократно при гипериммунизациях животных [126, 217]. В настоящее время за рубежом производятся также аналоги НАФ – монтаниды [24, 170].

При производстве масляных адъювантов в масляную основу часто вносят иммуностимулирующие добавки, которые позволяют сбалансировать и усилить иммунный ответ. К таким добавкам можно отнести сквален, сапонин, витамин Е, 3-деацелированный монофосфориллипид А (MPL), трегалозу, 6,6-димиколат (TDM), мурамилдипептид (MDP). Сквален представляет собой каротиноид, получаемый в виде масляных растворов из оливок и печени рыб. Его добавляют в адъюванты MF59 [168, 202], AS03 [127], RAS[®] [120, 217, 231]. MPL является инактивированным ЛПС сальмонелл, сапонин – гликозидом растительного происхождения. Оба препарата входят в состав адъюванта AS02 [128, 199], а MPL – ещё и в RAS[®] [120, 217, 231]. MDP представлен соединением N-ацетилмурамовой кислоты с L-аланил-И-изоглютамин дипептидом, а TDM – гликолипидом клеточной стенки микобактерий. Данные препараты являются компонентами RAS[®]. [120, 217, 231].

3. Полиэлектrolитные адъюванты связываются с антигенами, образуя комплексы, оседающие на клетках иммунной системы, что повышает активность последних [7, 32]. Полиэлектrolиты усиливают фагоцитарную функцию макрофагов и выделение ими лимфокинов, которые способствуют дифференцировке Т-лимфоцитов в хелперные клетки. Напрямую на Т-хелперов полиэлектролиты не влияют [48, 65]. Также полиэлектролитные адъюванты в несколько раз увеличивают миграцию лимфоцитов из основных органов иммунной системы в селезёнку [8, 9, 48] и количество антителообразующих клеток [16, 32, 48]. Положительное влияние полиэлектролитов на В-лимфоциты может происходить без участия Т-клеток [16, 32, 48]. При использовании полиэлектролитных адъювантов иммунитет создаётся сбалансированным – гуморально-клеточным. Количество антител возрастает в несколько раз [48]. Может проявляться аллергическая реакция замедленного типа, что свидетельствует о развитии клеточного иммунитета [2, 162]. Использование

полиэлектролитов профилактует иммунологическую толерантность [66] и усиливает иммунологическую память [48, 121]. По иммуностимулирующему эффекту при иммунизации белковыми антигенами полиэлектролиты могут превосходить ПАФ [38, 48, 53]. С увеличением дозы полиэлектролита возрастают его адьювантные свойства, однако многие из веществ данной группы обладают токсичностью [9, 48]. Положительный эффект от использования полиэлектролитных адьювантов во многом зависит от вида иммунизируемого животного [47] и природы антигена. Успешной иммунизации подвергались многие виды сельскохозяйственных (КРС, овцы, свиньи) и лабораторных животных [28, 45, 47, 53]. Иммунизации проводили бактериальными антигенами и вирусными [26, 28, 32, 39, 45, 47, 53]. Отмечено, что отдельная инъекция полиэлектролита и антигена не вызывает значительного адьювантного эффекта [3]. Для усиления белковых антигенов необходимы электростатическое их взаимодействие с полиэлектролитом [38, 48], а для полисахаридных антигенов требуются более жесткие ковалентные связи [39].

Из полиэлектролитов в качестве адьювантов были успешно испытаны поли-4-винилпиридин, полиазолидинаммоний, модифицированный гидратионами йода (ПААГ), полиоксидоний, полиакриловая кислота, декстран-сульфат, сополимеры N-винилпирролидона с акриловой кислотой или N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпирридином [9, 12, 16, 18, 45, 94].

Одним из перспективных полиэлектролитных адьювантов является полиазолидинаммоний. Он имеет значительный положительный заряд, т.е. является поликатионом. Образуется он при взаимодействии целлюлозогликолевой кислоты с дигидрокверцетином. После модификации его ионами йода образуется ПААГ. Химическое строение ПААГ представлено на рисунке 1.

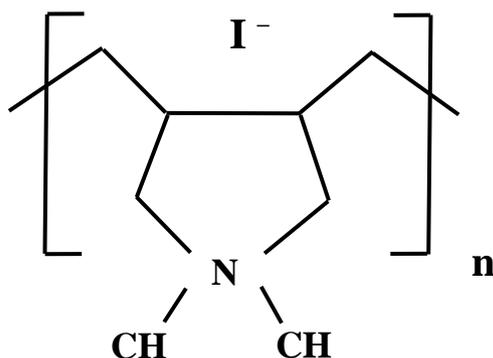


Рисунок 1 – Химическое строение молекулы ПААГ

Ионы йода позволяют использовать ПААГ в качестве бактерицидного средства [6] не токсичного для животных и людей [43, 46, 56]. Спектр его антимикробного действия достаточно широк и распространяется на бактериальную, грибную и вирусную микрофлору [6]. Впервые в качестве адъюванта для вакцин ПААГ был испытан на КРС в комбинации с бруцеллёзным антигеном и микрочастицами карбоната кальция [46]. Затем ПААГ применили для гипериммунизации кроликов дезинтегрированными мембранами *Y. pseudotuberculosis* [12] и *Xanthomonas campestris* [51], а также с ЛПС *Y. pseudotuberculosis* [161]. Титры специфических антител не уступали по величине титрам, полученным при использовании ПАФ.

В настоящее время многие исследователи считают изучение адъювантных свойств наночастиц (НЧ) перспективным направлением науки. К наноадъювантам можно отнести: полимерные НЧ, липосомы, вирусоподобные частицы (ВПЧ), иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), неорганические НЧ и др. Полимерные НЧ представлены синтетическими НЧ (поли-d,l-лактид-ко-гликолид, поли-d,l-молочно-когликолевая кислота, поли-γ-глутаминовая кислота и др.) [76, 79, 182] или природными НЧ (хитозан, пуллулан и др.) [183, 224]. Липосомы представляет собой фосфолипидные оболочки, образующие сферы [167]. ISCOM также имеет форму сферы, содержащей сапонин, холестерин и фосфолипиды [151]. ВПЧ состоят из капсидных белков вирусов, которые сами могут являться антигенами или нести на себе другие антигенные частицы [175]. Неорганические НЧ могут иметь в своём составе: оксиды

алюминия [142], железа [153], цинка [251], кремния [241]; гидроксиды алюминия [207], магнезия [206], железа [139]; фосфат кальция [98, 229]; углерод [209, 221]; серебро [219]; золото и др. Частицы могут полностью состоять из одного вещества или иметь структуру ядро-оболочка, в которой используются два разных вещества, например, ядро из Fe_3O_4 , а оболочка из ZnO [75].

На адъювантные свойства НЧ, кроме их химической структуры, существенно влияют такие параметры, как размер, форма [137], способ связи с антигеном [76, 107, 165, 167], величина и знак заряда [137]. Наиболее эффективное соотношение данных параметров индивидуально для каждой химической группы нанoadъювантов. Соединение антигена с твёрдой НЧ является обязательным условием эффективного их взаимодействия. Различают 4 способа связи НЧ – антиген: адсорбция, соосаждение, конъюгация и инкапсуляция [98, 108, 167, 229].

Группа неорганических нанoadъювантов являются самой разнообразной по химической структуре. Механизм адъювантного воздействия данной группы НЧ на иммунную систему животного заключается: в защите антигена от деградации, созданию антигенного "депо", активизации макрофагов, увеличении количества специфических антител, формировании сбалансированного иммунитета и иммунологической памяти. [165]. Однако отмечено, что НЧ гидроксида алюминия [207], а также НЧ углерода [209, 221] и серебра [219], стимулируют только гуморальную составляющую иммунитета. При сравнении эффективности различных адъювантов было установлено, что по степени стимуляции антителогенеза многие неорганические НЧ превосходят гидроксид алюминия [139, 146], а некоторые – даже масляные адъюванты [146, 219]. Адъювантный эффект неорганических НЧ был установлен для многих белковых антигенов возбудителей вирусных инфекций [139, 141, 149], бактериальных инфекций [85, 139, 219] и протозойных заболеваний [153, 220]. Также была изучена возможность применения неорганических НЧ в комплексе с целыми вирионами болезни Ньюкасла, гриппа А, энтеровирусом [96, 171, 223] и ДНК вируса ящура и токсоплазмы [97, 236].

Одной из наиболее интенсивно развивающихся групп неорганических наноадьювантов являются ЗНЧ различных размеров и форм. В некоторых случаях они по своему адьювантному эффекту превосходят масляные [133, 140, 219, 235] и алюминиевые [140, 242] адьюванты. Однозначных рекомендаций по размерам и форме ЗНЧ мы в литературе не встретили. Размер ЗНЧ может составлять от 1 до 100 нм [173, 222], а форма может быть в виде сферы, куба [132], стержня [131, 132, 140], звезды [131, 133] и др. Наибольшее число публикаций с эффективным применением ЗНЧ в качестве адьюванта приходится на сферические частицы диаметром 15-25 нм [109, 115, 131, 140, 145, 148, 172, 176, 184, 194, 215, 219, 235].

Обладая незначительной токсичностью [87], ЗНЧ позволяют создавать сбалансированный иммунитет у животных [169, 172, 210]. Воздействие ЗНЧ на гуморальную составляющую иммунитета проявляется в увеличении числа фолликулов в селезенке [194] и высокими титрами сывороточных и секреторных иммуноглобулинов классов G и A [132, 140, 169, 172, 210, 222]. Одновременно некоторыми авторами отмечается активация также клеточной составляющей иммунитета [169, 172, 210]. Сбалансированность иммунитета во многом определяется одновременной стимуляцией созревания Th1- и Th2-лимфоцитов под влиянием активированных дендритных клеток и макрофагов [109, 148, 194, 215, 235,], а также цитокинов: IFN- γ (стимулятор гуморального иммунитета) [109, 140, 148, 158, 169, 172, 194, 210, 235] и IL4, IL10 (стимуляторы клеточного иммунитета) [172, 210, 242].

Как и все остальные неорганические адьюванты ЗНЧ защищают антиген от разрушения и депонируют его [173]. Связываясь с антигеном ЗНЧ значительно снижают свою токсичность и токсичность антигена [84, 87, 194, 215]. ЛПС плохо конъюгируются с ЗНЧ и его конъюгаты менее эффективны, в отличие от белковых [176]. Способность к конъюгации с ЗНЧ снижается с ростом величины белковой молекулы [145]. Однако процесс конъюгации значительно облегчается при использовании лигандов – молекул-посредников между ЗНЧ и белком [118]. ЗНЧ использовали для усиления вирусных и

бактериальных антигенов. В качестве антигенов выступали изолированные из возбудителей, синтезированные и рекомбинантные протеины или пептиды, а также полисахариды или ЛПС [118].

Комплексы ЗНЧ с антигеном вводили белым мышам [84, 87, 131, 132, 140, 143, 145, 148, 169, 172, 176, 210, 219, 222], крысам [109, 143], морским свинкам [194, 215, 235], кроликам [115, 143, 145, 148, 173, 176, 184, 215], цыплятам [158, 222] различными путями: внутрибрюшинным, подкожным, внутрикожным, внутримышечным, внутривенным, интранозальным. После попадания в организм животного ЗНЧ накапливается в различных паренхиматозных органах, сердце, лимфатических узлах [84, 87, 210]. Гипериммунизации с использованием ЗНЧ проводили редко. В основном у мышей [131, 143, 169, 210] и кроликов [115, 143, 145, 148, 184, 215]. При этом количество иммунизаций составляло от 3 до 7, а длительность интервалов между иммунизациями – 1-2 недели.

Усилить иммуностимулирующее действие ЗНЧ позволяет его использование в комплексе с другими адъювантами: ПАФ [131, 145, 176, 184, 235] цитозин-фосфат-гуанозин олигодезоксинуклеотидом [131] и др. Данный приём используется также при изготовлении вакцин. ЗНЧ входит в качестве адъюванта в состав противовирусных вакцин [133, 222], а также противобактериальных [176, 184].

Таким образом, полиэлектролиты и ЗНЧ можно отнести к перспективным адъювантам, создающим сбалансированный иммунитет. Пригодность их для получения гипериммунных сывороток крови изучена недостаточно. Также в литературе нет данных по использованию данных адъювантов в комплексе с ДА. Результаты проведённого анализа литературных источников свидетельствуют о перспективности проведения исследований, направленных на изучение адъювантной активности ПААГ и ДА при гипериммунизациях животных ДА псевдотуберкулёзного микроба.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Использованные микроорганизмы

В научной работе были использованы штаммы бактерий из коллекции бактериальных культур ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора:

- *Yersinia pseudotuberculosis* I O:1 сероварианта (*Y. pseudotuberculosis* O:1),
- *Yersinia pseudotuberculosis* III O:3 сероварианта (*Y. pseudotuberculosis* O:3),
- *Yersinia pseudotuberculosis* IV O:4 сероварианта (*Y. pseudotuberculosis* O:4),
- *Yersinia pseudotuberculosis* V O:5 сероварианта (*Y. pseudotuberculosis* O:5),
- *Yersinia enterocolitica* 66-82 O:3 сероварианта (*Y. enterocolitica* O:3),
- *Yersinia enterocolitica* 82-82 O:5 сероварианта (*Y. enterocolitica* O:5),
- *Yersinia enterocolitica* 295-82 O:6 сероварианта (*Y. enterocolitica* O:6),
- *Yersinia enterocolitica* 383 O:9 сероварианта (*Y. enterocolitica* O:9),
- *Enterobacter aerogenes* ATCC-13048 (*Enterobacter aerogenes*),
- *Escherichia coli* 4295 (*Escherichia coli*),
- *Proteus vulgaris* 19 (*Proteus vulgaris*),
- *Salmonella typhimurium* 1626 (*Salmonella typhimurium*).

При испытании созданной иммуноферментной тест-системы также были использованы штаммы бактерий, ранее выделенные от сельскохозяйственных животных:

- *Yersinia pseudotuberculosis* №40 O:3 сероварианта (*Y. pseudotuberculosis* №40),
- *Yersinia pseudotuberculosis* №67 O:3 сероварианта (*Y. pseudotuberculosis* №67),
- *Yersinia enterocolitica* №12 O:3 сероварианта (*Y. enterocolitica* №12),
- *Yersinia enterocolitica* №58 O:3 сероварианта (*Y. enterocolitica* №58).

Бактериологическое исследование животноводческих хозяйств Саратовской области, проведённое нами в процессе испытания экспериментальной иммуноферментной тест-системы, сопровождалось

выделением штаммов энтеропатогенных иерсиний. Данные штаммы представлены в разделах 2.3.7. и 2.3.8. диссертации.

Иерсинии культивировали на плотных и жидких питательных средах при температуре 26 °С в течение 2 суток, а бактерий из других родов выращивали – при 37 °С сутки.

Формализированные бактериальные клетки получали обработкой отмытой бактериальной взвеси 1%-м формалином в течение 12 часов при комнатной температуре с последующей проверкой стерильности. Хранили формализированные клетки в холодильнике в 0,1%-м растворе формалина и перед использованием отмывали. Взвесь клеток *Brucella abortus* получали из единого бруцеллёзного антигена производства ОАО "Покровский завод биопрепаратов".

Определённую концентрацию микробных клеток готовили, используя стандарты мутности производства ООО "ОРМЕТ", г. Екатеринбург.

Использованные животные

Получение гипериммунных сывороток крови осуществляли иммунизацией 60 кроликов породы "Шиншилла" массой 2,5-3 кг и 10 морских свинок массой 0,4-0,5 кг, которые содержались в стационаре ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ.

В экспериментах с ЗНЧ использовали 36 беспородных белых мышей массой 20-22 г.

Для лабораторного испытания созданной иммуноферментной тест-системы использовали фекалии от нескольких свиней, содержащихся в стационаре ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ.

Циркуляцию энтеропатогенных иерсиний у сельскохозяйственных животных и завершающее испытание тест-системы проводили на 405 свиньях и 454 телятах из животноводческих хозяйств Саратовской области.

При проведении экспериментов над животными руководствовались законом РФ от 1.01.1997 г "О защите животных от жестокого обращения" и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г). Также в работе использовали ГОСТ 33216-2014 "Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами".

Использованное оборудование

В работе использовалось следующее оборудование: центрифуга лабораторная Sigma-202MK Refrigerated, фирмы "Sigma" (США); центрифуга лабораторная T24D, фирмы "MLW" (Германия); спектрофотометр Genesys 10S UV-Vis, фирмы "Thermo Fisher Scientific, Inc." (США); рН-метр рН-150МИ, фирмы ООО "Измерительная техника" (Россия); поляризационно-интерференционный микроскоп Biolar PI, фирмы "PZO" (Польша); автоматический планшетный фотометр Plate Screen Vet, фирмы "Hospitex Diagnostics" (Италия); аналитические весы Explorer Pro EP214C, фирмы "Ohaus Europe" (Швейцария); анализатор гематологический Micro CC-20 Plus, фирмы "High Technology, Inc." (США); модульный шейкер-инкубатор Unimax 1010-Inkubator 1000, пр-ва Heidolph (Германия); лабораторные электронные весы AND HL-200i, пр-ва A&D (Япония); термостаты электрические суховоздушные типа ТС-1/80 СПУ, производства "ОАО Смоленское СКТБ СПУ" (Россия); лиофильная сушка ScanVac CoolSafe Basic 55-4, фирмы LaboGene (Дания) и другое оборудование.

Использованные химические реактивы и расходные материалы

Использованные отечественные реактивы соответствовали ГОСТам и относились к категории химически чистых и чистых для анализа, а импортные реактивы принадлежали таким широко известным производителям, как "Serva", "Merck", "Sigma", "Pharmacia", "Fluka".

При постановке ИФА использовали 96-луночные полистироловые микропланшеты, производства фирм "Jet Biofil" (Китай).

Диализ осуществляли в диализном мешке ТЗ с размером пор 12-14 кДа производства "Orange Scientific" (Бельгия).

Использованные растворы

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

Готовили растворы А и Б:

А) 14,2 г Na_2HPO_4 растворяли в 1 литре дистиллированной воды;

Б) 7,8 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяли в 0,5 литрах дистиллированной воды.

Для приготовления 0,1 М ФСБ смешивали 810 мл раствора А и 190 мл раствора Б. Доводили рН до 7,2-7,4 добавлением растворов А или Б. Раствор хранили при 4 °С в течение 6 месяцев.

Непосредственно перед использованием готовили 0,01 М ФСБ.

ФСБ рН=7,2-7,4 с твином-20 (ФСБ-Т)

Добавляли к 1 литру ФСБ рН=7,2-7,4 0,5 мл твина-20.

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

Готовили растворы А и Б:

А) 25,14 г NaHCO_3 растворяли в 3 литрах дистиллированной воды;

Б) 5,29 г Na_2CO_3 растворяли в 0,5 литрах дистиллированной воды.

Для приготовления 0,1 М КББ смешивали 270 мл раствора А и 30 мл раствора Б. Доводили рН до значения 9,2-9,4. Раствор хранили при 4 °С в течение 6 месяцев.

Непосредственно перед использованием готовили 0,01 М КББ.

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

Растворяли в 25 мл дистиллированной воды 1,78 г Na_2HPO_4 и 0,96 г лимонной кислоты.

Субстратная смесь для ИФА

Растворили в 25 мл ЦФБ 0,01 г ортофенилдиамина и 0,5 мл 3%-й перекиси водорода. Смесь готовили за 10-15 минут до использования.

Стоп-раствор для ИФА

Для приготовления 2 н раствора соляной кислоты смешивали 25 мл дистиллированной воды и 4,5 мл 38%-й HCl.

Раствор тетразоля бромиды голубого

Для приготовления 0,3%-го раствора тетразоля бромиды голубого растворяли 3 мг вещества в 10 мл 0,01 М ФСБ pH=7,2-7,4. Раствор хранили в темной посуде в условиях холодильника до 2-х недель.

Раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА)

Для получения 2%-го раствора БСА 0,9 г вещества растворяли в 45 мл 0,01 М ФСБ pH=7,2-7,4. Раствор не хранят.

Щелочной раствор

Готовили растворы А и Б:

А) 40 г NaOH растворяли в 100 мл дистиллированной воды;

Б) 0,5 г NaCl растворяли в 100 мл дистиллированной воды;

Стерилизовали растворы автоклавированием при 121 °С 30 минут.

Для получения 0,5%-го щелочного раствора смешивали растворы А и Б: 9,5 мл 0,5%-го NaCl и 0,13 мл 40%-го NaOH.

Использованные питательные среды и биохимические тест-системы

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

Готовили растворы А и Б:

А) 11,87 г Na₂HPO₄ растворяли в 1 литре дистиллированной воды;

Б) 4,54 г KH₂PO₄, растворяли в 0,5 литрах дистиллированной воды.

Смешивали 850 мл раствора А и 150 мл раствора Б. Полученный раствор разливали в пробирки по 5 мл и стерилизовали автоклавированием при 121 °С 30 минут.

Забуференная пептонная вода (ЗПВ)

Для приготовления 1%-й ЗПВ растворяли 10 г пептона в 990 мл ФСБ рН=7,6-7,8, разливали в пробирки по 5 мл и стерилизовали при 121 °С 30 минут. Использовали пептон ферментативный производства ООО "Биотехновация" (г. Москва).

Коммерческие питательные среды и биохимические тест-системы

1. "Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая", производства ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ), г. Оболенск Московской области (питательный агар).

2. "Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон)" производства ФБУН ГНЦ ПМБ (питательный бульон).

3. "Питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (Агар ЭНДО-ГРМ)" производства ФБУН ГНЦ ПМБ (среда Эндо).

4. "Питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (Среда Гисса-ГРМ с глюкозой)" производства ФБУН ГНЦ ПМБ (среда Гисса с глюкозой).

5. "Агар бактериологический" производства ФБУН ГНЦ ПМБ.

6. "Среда Кларка (глюкозофосфатный бульон)" производства ООО "НПЦ БиоКомпас С" г. Углич Ярославской области (среда Кларка).

7. Микро-ЛА-Тест ЭНТЕРОтест 24 N производства фирмы "Erba Lachema" (Чехия).

Использованные коммерческие диагностические 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 ФБУН 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. Сыворотка диагностическая к вирулентным *Y. enterocolitica* адсорбированная кроличья сухая для РА производства ФБУН НИИЭМ им. Пастера.
4. Сыворотки диагностические эшерихиозные агглютинирующую ОК-поливалентные сухие для РА (ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ), производства АО "Биомед" им. И.И. Мечникова.
5. Сыворотка диагностическая сальмонеллёзная адсорбированная поливалентная основных серогрупп (А, В, С, D, Е) для РА производства ФГУП СПбНИИВС ФМБА России.
6. Сыворотка диагностическая бруцеллёзная поливалентная кроличья жидкая для РА производства ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора.
7. Ig G (H&L) антикроличьи поликлональные, полученные от козы, конъюгированные с пероксидазой хрена производства "Sigma" (США).
8. Ig G (H&L) антимышиные поликлональные, полученные от козы, конъюгированные с пероксидазой хрена производства "Sigma" (США).
9. Ig G (H&L) против морской свинки поликлональные, полученные от козы, конъюгированные с пероксидазой хрена производства "Sigma" (США).
10. Антиген бруцеллезный единый для РА, РСК, РДСК из набора компонентов для диагностики бруцеллеза животных в РА, РСК и РДСК производства ОАО "Покровский завод биопрепаратов".

11. Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации γ -интерферона в сыворотке крови производства АО "Вектор-Бест", г. Новосибирск.

12. Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-6 в сыворотке крови и моче производства АО "Вектор-Бест", г. Новосибирск.

13. Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-6 в сыворотке крови и моче производства АО "Вектор-Бест", г. Новосибирск.

Исследование животных бактериологическим методом

Было исследовано 405 свиней 2-4 месячного возраста и 454 телёнка в возрасте 3-6 месяцев. Фекалии для исследования забирали из прямой кишки ватным тампоном в пробирку с ФСБ и помещали посеvy в холодильник для накопления иерсиний. Высевы со среды накопления на чашки со средой Эндо проводили на 3-е и 6-е сутки петлём, предварительно подвергая высеваемый материал щелочной обработке. Для этого смешивали равные количества исследуемой пробы и 0,5%-го щелочного раствора в течение 4-х минут. Через двое суток инкубации при 26 °С изучали колонии, выросшие на среде Эндо. Характерные для иерсиний мелкие лактозонегативные колонии пересеивали на мясопептонные среды и идентифицировали микроскопией с окраской по методу Грама, биохимическим исследованием и ОРА с моновалентными иерсиниозными сыворотками.

Биохимические исследования проводили на диагностических пластинах Микро-ЛА-Тест ЭНТЕРОтест 24 N, а также в отдельных тестах на обнаружение индола и оксидазы фирмы "Erba Lachema". Работу с биохимическими тестами фирмы "Erba Lachema" осуществлялась в соответствии с прилагаемой к ним инструкцией. Дополнительно проводили посев выделенных культур на полужидкую среду Гисса с глюкозой.

Подвижность бактерий определяли на полужидком агаре.

ОРА с моновалентными иерсиниозными сыворотками производства ФГУН НИИЭМ им. Пастера проводили в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Определение вирулентных свойств энтеропатогенных иерсиний

Как известно, вирулентность энтеропатогенных иерсиний связана с присутствием в клетке бактерии плазмиды pYV, которую можно обнаружить в тестах: аутоагглютинации, пигментсорбции, температурозависимости роста колоний, а также ОРА с сывороткой к вирулентным иерсиниям (СВИ).

Аутоагглютинацию проводили в среде Кларка. Одну пробирку со средой с посевом иерсиний инкубировали при 37 °С, а другую – при 26 °С в течение 2 суток. Вирулентные иерсинии агглютинировали при 37 °С в виде хлопьев на дне и стенках пробирки.

Для определения пигментсорбции готовили мясопептонный агар с 0,05 мг/мл красителя конго-красного. Засевали шпателем поверхность агара культурой иерсиний и инкубировали 2 суток при 26 °С, а затем ещё 3 суток при 4 °С. Мелкие, красного цвета колонии характерны для вирулентных иерсиний, не вирулентные штаммы образуют более крупные бесцветные колонии.

Температурозависимость морфологии колоний иерсиний определяли двух чашках Петри с питательным агаром. Одну чашку инкубировали при 37 °С, вторую – при 26 °С. Вирулентные иерсинии плохо растут при 37 °С, образуя в 1,5-3 раза более мелкие колонии, чем при 26 °С.

СВИ использовали в соответствии с прилагаемой к ней инструкцией.

Получение ДА энтеропатогенных иерсиний

2-х суточную культуру иерсиний, выращенную при 26 °С на питательном агаре, проверяли на отсутствие посторонней микрофлоры при помощи световой микроскопии и изучения культуральных признаков. Культуру бактерий с

характерной для иерсиний морфологией смывали с питательной среды, отмывали 2-хратно центрифугированием при 5 тыс. об./минуту и заливали ацетоном в соотношении 1:3. После полуторачасовой инкубации на шейкере при 37 °С, осаждали микробные клетки центрифугированием и удаляли ацетон. Обработку бактерий ацетоном повторяли 2-хкратно. Затем бактериальную массу высушивали при комнатной температуре и измельчали до состояния "ацетонового порошка", который был использован для получения ДА иерсиний.

"Ацетоновый порошок" заливали диметилсульфоксидом в соотношении 1:6, инкубировали на шейкере при 37 °С 40 минут, осаждали центрифугированием при 5 тыс. об./минуту и удаляли осадок. Надосадочную жидкость, содержащую ДА, диализировали против 0,01 М КББ 10 часов при комнатной температуре, с перемешиванием и четырёхкратной сменой КББ. Полученный ДА лиофильно высушивали.

Изучение антигенной активности белков ДА энтеропатогенных иерсиний

Для определения соотношения белков и углеводов в ДА иерсиний использовали методы М.М. Bradford, 1976 [95], и фенольный метод [105].

Состав белковых фракций исследовался методом электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по U.K. Laemmli, 1970 [163]. Визуализацию белков в геле проводили Кумасси синим R-250 (Merck, Германия).

После разделения белков в электрофорезе проводили иммуноблоттинг по методу H. Towbin et al., 1979 [232]. В иммуноблоттинге была использована гипериммунная сыворотка крови кролика, полученная к ДА псевдотуберкулёзного микроба, а также антикроличьи антитела, меченные пероксидазой хрена производства ИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Разделение белков и изучение их антигенной активности были проведены в лаборатории холерных вакцин ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора. Полученные результаты были нам любезно предоставлены

М.Н. Киреевым, кандидатом медицинских наук и ведущим научным сотрудником данной лаборатории.

*Получение гипериммунной сыворотки кролика и морской свинки
к ДА энтеропатогенных иерсиний*

Кроликов и морских свинок иммунизировали подкожно вдоль спины в 3-4 точки 5-тикратно с интервалом в 2 недели. Объем вводимой смеси составлял 1 мл и был представлен равными частями ДА иерсиний и адьювантом. Перед очередной иммунизацией из ушной вены кролика брали кровь для исследования в объеме 5 мл. Завершающее взятие крови проводили через 2 недели после 5-й иммунизации без умерщвления. У морской свинки кровь брали однократно из сердца в процессе тотального обескровливания.

Полученную кровь инкубировали при комнатной температуре 1 час. Затем от сгустка отделяли сыворотку, которую разливали по 100 мкл в микропробирки и хранили замороженным виде.

*Проведение непрямого твёрдофазного ИФА на планшетах
для определения антител*

1. В лунки микропланшета вносили по 100 мкл раствора антигена и инкубировали 60 минут при 37 °С на шейкере. Затем планшет 3-хкратно промывали 0,01 М ФСБ-Т.
2. В лунки микропланшета вносили по 200 мкл 2%-го раствора БСА на 30 минут при 37 °С на шейкере. После инкубации лунки промывали.
3. В лунки вносили 100 мкл специфической гипериммунной сыворотки с инкубацией на шейкере в течение 30 минут при 37 °С. Промывали 3-хкратно лунки 0,01 М ФСБ-Т.
4. В лунки планшета вносили по 100 мкл конъюгата антивидовых иммуноглобулинов с пероксидазой, разведённого 1:20000. Проводили инкубацию на шейкере 30 минут при 37 °С и промывание – 3-хкратно.

5. В лунки вносили по 100 мкл субстратной смеси и через 5 минут к ней добавляли 100 мкл стоп-раствора.
6. На автоматическом планшетном фотометре измеряли оптическую плотность содержимого лунок при длине волны 490 нм. Оптическая плотность в лунках с положительным результатом должна превышать данный показатель в лунках с отрицательным контролем не менее чем в 2 раза. При проведении ИФА ставили "отрицательные" и "положительные" контроли [138].

*Проведение непрямого твёрдофазного ИФА на планшетах
для определения антигена*

1. В лунки микропланшета вносили по 100 мкл экспериментально полученной гипериммунной сыворотки крови морской свинки в разведении 1:200 и инкубировали 60 минут при 37 °С на шейкере. Затем планшет 3-хкратно промывали 0,01 М ФСБ-Т.
2. В лунки микропланшета вносили по 200 мкл 2%-го раствора БСА на 30 минут при 37 °С на шейкере. После инкубации лунки промывали.
3. В лунки микропланшета вносили по 100 мкл различные разведения исследуемого антигена и инкубировали 30 минут при 37 °С на шейкере. Затем планшет 3-хкратно промывали 0,01 М ФСБ-Т.
4. В лунки вносили 100 мкл специфической экспериментальной гипериммунной сыворотки крови кролика в разведении 1:200 и инкубацией на шейкере в течение 30 минут при 37 °С. Промывали 3-хкратно лунки 0,01 М ФСБ-Т.
- 5-7. Дальнейшие исследования осуществляли в соответствии с пунктами 4-6 методики проведения ИФА, описанной для определения антител.

Подсчёт количества лейкоцитов в крови животных

Кровь в объёме 1 мл брали из ушной вены кролика в пробирки с антикоагулянтом – ЭДТА. Подсчет количества лейкоцитов, агранулоцитов и гранулоцитов проводили на гематологическом анализаторе после освобождения крови от эритроцитов. Подготовку образца перед замером и сам замер количества клеток проводили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

*Получение ЗНЧ и конъюгирование их с ДА *Y. enterocolitica**

Золотые наночастицы диаметром 15 нм и конъюгат ЗНЧ с ДА *Y. enterocolitica* были приготовлены в лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН (г. Саратов) и любезно предоставлены Л.А. Дыкманом, доктором биологических наук, старшим научным сотрудником данной лаборатории.

Золотые наночастицы получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия по методу G. Frens [125]. Для этого смешивали 242,5 мл нагретого 0,01%-го водного раствора золотохлористоводородной кислоты с 7,5 мл 1%-го водного раствора цитрата натрия. Реакцию проводили в колбе Эрленмейера на магнитной мешалке с обратным водяным холодильником. Средний размер частиц контролировали спектрофотометрически и методом просвечивающей электронной микроскопии.

Конъюгат ЗНЧ с ДА *Y. enterocolitica* получали простой физической адсорбцией. Концентрация антигена в конъюгате составляла 25 мкг/мл.

Исследование белых мышей иммунизированных конъюгатом ЗНЧ

*с ДА *Y. enterocolitica**

Были иммунизированы 6 групп мышей. В каждой группе находилось по 6 животных. Препараты им вводили внутривентриально двукратно с интервалом 10 дней в объёме 0,5 мл. Для иммунизации использовали ДА *Y. enterocolitica* в дозе по белку 25 мкг на животное. В качестве адъювантов

использовали: ЗНЧ, ПАФ, ЗНЧ+ПАФ. Убой мышей проводили через 10 дней после последней инъекции. Соотношение антигена и адьюванта в препарате составляло 1:1. Через 10 суток после последней иммунизации мышей декапитировали.

Перитонеальные макрофаги извлекали промыванием брюшной полости мыши 3 мл ФСБ. Отмытые после извлечения из мыши макрофаги помещали в 0,9 мл 0,3%-го раствора тетразоля бромида голубого для образования гранул формазана в клетках, а также определяли концентрацию клеток в полученной взвеси на гематологическом анализаторе. Через час инкубации на шейкере при 37 °С клетки перемещали из раствора красителя в диметилсульфоксид для растворения формазана и измеряли плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 570 нм. Рассчитывали количество формазана на 1 клетку макрофага. Высокая дыхательная активность макрофага указывала на активность клеточного иммунитета [90].

Кровь для исследования брали из шейных сосудов в пробирку с активатором кровяного сгустка – диоксидом кремния. После отделения от сгустка крови сыворотку замораживали для хранения.

Наличие в сыворотке специфических антител к ДА *Y. enterocolitica* определяли методом непрямого твёрдофазного ИФА на планшетах, описанным выше.

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

*Исследование сред накопления с фекалиями свиней искусственно
контаминированными энтеропатогенными иерсиниями*

Готовили взвесь свиных фекалий на ФСБ 1:10 и смешивали её 1:1 с 10-ти кратными разведениями клеток *Y. enterocolitica* или *Y. pseudotuberculosis* из расчёта получения микробных взвесей с 5×10^6 по 5×10^1 м.к./мл. Среды

накопления (ФСБ рН=7,6-7,8 и ЗПВ) разливали в пробирки по 4,5 мл, стерилизовали и вносили в них 10% полученной взвеси фекалий с бактериями для создания микробных концентраций: 5×10^5 , 5×10^3 , 50, 5 м.к./мл.

Обсеменённые среды накопления инкубировали при 4 °С в течение 6 суток. На 3-и и 6-е сутки "холодового обогащения" их исследовали, предварительно обработав 1%-м раствором формалина в течение 4-х часов.

ИФА проводили по методике, описанной выше, титруя в лунках планшета вместо антигена обсеменённую среду накопления.

Количество иерсиний на средах накопления контролировали высевом на чашки Петри со средой Эндо.

Статистическая обработка полученных результатов

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

2.2. Результаты исследований и их обсуждение

2.2.1. Изучение химических и антигенных свойств ДА *Y. pseudotuberculosis*

Нами был впервые получен ДА *Y. pseudotuberculosis* по методике, использованной А. Хаджу для выделения ДА *Y. enterocolitica* [14]. Из 1 г псевдотуберкулёзной культуры, нами было получено 250 мг ацетонового порошка или 2,5 мг лиофилизированного ДА *Y. pseudotuberculosis*. Также для проведения в дальнейшем сравнительного анализа нами был выделен ДА *Y. enterocolitica*, ранее изученный в работе А. Хаджу.

Для выделения ДА энтеропатогенных иерсиний были использованы музейные штаммы иерсиний, полученные из коллекции патогенных микроорганизмов ГКПМ ФГУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора: *Y. pseudotuberculosis* III О:3 сероварианта и *Y. enterocolitica* 66-82 О:3 сероварианта. Перед использованием бактериальные культуры были проверены на наличие у них характерных морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств.

В выделенных ДА было определено соотношение белков и углеводов, которое составило: для ДА *Y. pseudotuberculosis* – 30:1, а для ДА *Y. enterocolitica* – 10:1. Преобладание белков в химическом составе ДА потребовало более детального изучения свойств.

Был определён спектр белков, входящих в состав ДА *Y. pseudotuberculosis* (ДА *Y. p.*), ДА *Y. enterocolitica* (ДА *Y. e.*) и цельных клеток псевдотуберкулёзного (ЦК *Y. p.*) и кишечной иерсиниозной (ЦК *Y. e.*) микробов. Результаты электрофореза представлены на рисунке 1.

В составе ДА *Y. pseudotuberculosis* и ДА *Y. enterocolitica* преобладают белки с молекулярными массами: 45, 38 и 17 кДа, однако в ДА *Y. pseudotuberculosis* наблюдается дополнительный белок 20 кДа. Из перечисленных белков в наибольшем количестве в обоих ДА содержится белок 38 кДа, а содержание белка с молекулярной массой 17 кДа выше в ДА *Y. pseudotuberculosis*. Также на электрофореграмме выделяется скопление

неразделённых белков в области 26-37 кДа. У цельных клеток энтеропатогенных иерсиний, несмотря на общее сходство белковых спектров, наблюдаются различия по молекулярным массам и соотношениям количеств некоторых белков (Рисунок 1).

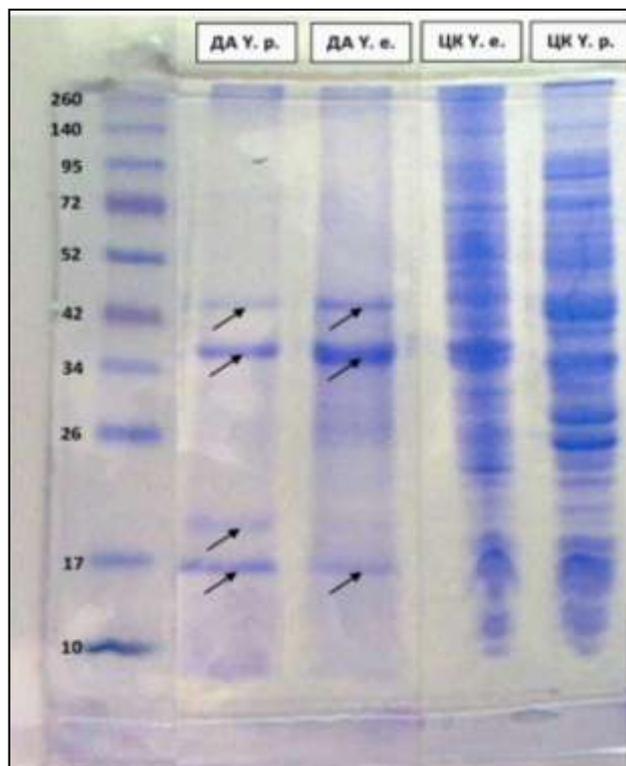


Рисунок 1 – Электрофорез белков ДА и цельных клеток энтеропатогенных иерсиний

На следующем этапе исследований нами была изучена роль отдельных белков ДА *Y. pseudotuberculosis* в антителогенезе. Для этого нами были получены сыворотки крови кроликов, иммунизированных ДА псевдотуберкулёзного микроба в комплексе с ПАФ. Для повышения специфичности сывороток нами была проведена пятикратная иммунизация животных. Полученные сыворотки крови были использованы в иммуноблоттинге с белками ДА псевдотуберкулёзного микроба (Рисунок 2).

Иммуноблоттинг показал наличие антител к белками с молекулярными массами 45, 38, 32, 28 кДа, входящими в состав ДА *Y. pseudotuberculosis*. Однако наиболее яркая реакция была отмечена с белком массой 38 кДа.

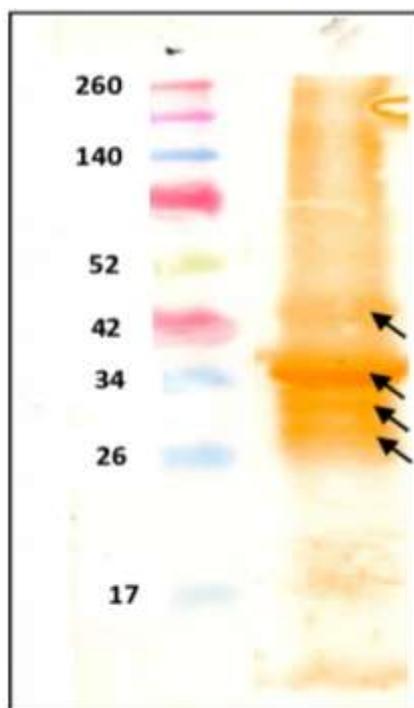


Рисунок 2 – Иммуноблоттинг белков ДА *Y. pseudotuberculosis* с сывороткой, полученной к ДА *Y. pseudotuberculosis*

По данному разделу исследований можно сделать следующие выводы:

1. ДА энтеропатогенных иерсиний имеют сходство. Они в наибольшем количестве содержат белки с молекулярными массами: 45, 38 и 17 кДа. В ДА *Y. pseudotuberculosis* дополнительно преобладает белок с массой 20 кДа.

2. Синтез антител в ДА *Y. pseudotuberculosis* провоцируют белки с молекулярными массами: 45, 38, 32, 28 кДа.

2.2.2. Сравнительная оценка специфической активности

ДА *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* и родственных им антител

Для выявления наиболее активного антигена была проведена сравнительная оценка активности ДА *Y. pseudotuberculosis* и ДА *Y. enterocolitica* с помощью коммерческих диагностических сывороток в ИФА. В таблице 5 представлены результаты испытаний антигенов с иерсиниозными сыворотками.

Таблица 5 – Антигенная активность ДА кишечной иерсиниозной и псевдотуберкулёзной микробов с иерсиниозными сыворотками

Диагностические сыворотки		Титры антител к ДА / двоичные логарифмы титров для n = 5			
		к ДА <i>Y. pseudo-tuberculosis</i>		к ДА <i>Y. enterocolitica</i>	
		титр	логарифм	титр	логарифм
Псевдотуберкулёзная для РНГА		1:25600	14,20±0,68	1:12800	13,22±0,89
Кишечноиерсиниозная О:3 для РНГА		1:12800	13,53±0,73	1:12800	13,47±0,82
Кишечноиерсиниозная О:9 для РНГА		1:12800	13,41±0,66	1:12800	13,64±0,70
Псевдо-туберкулёзные для ОРА	О:1	1:50	5,58±0,43	1:50	5,51±0,34
	О:3	1:100	6,63±0,50	1:50	5,79±0,23
Кишечно иерсиниозные для ОРА	О:3	1:400	8,71±0,43	1:400	8,65±0,28
	О:9	1:400	8,41±0,28	1:400	8,54±0,51

Примечание – "n" – количество повторов.

Активность обоих исследованных антигенов проявлялась как с псевдотуберкулёзной, так и с кишечной иерсиниозной сыворотками, т. е. отмечалась родовая специфичность у данных фракций.

Следует отметить, что кишечной иерсиниозные сыворотки для ОРА выпускаются производителем с более высокой активностью, чем псевдотуберкулёзные, это было подтверждено нами в реакциях с цельными клетками энтеропатогенных иерсиний при проведении опытов, вынесенных за пределы данной диссертации.

Антигенная активность у псевдотуберкулёзного ДА оказалась выше, чем у кишечной иерсиниозного ДА, что делает его более перспективным для создания диагностического препарата (Таблица 5).

В таблице 6 представлены результаты изучения антигенных свойств двух ДА в ИФА с коммерческими сыворотками, содержащими антитела к бактериям других родов: бруцеллам, сальмонеллам, эшерихиям.

Таблица 6 – Антигенная активность ДА кишечной синеозной и псевдотуберкулёзного микробов с сыворотками к бактериям других родов

Диагностические сыворотки		Титры антител к ДА / двоичные логарифмы титров для n = 5			
		к ДА <i>Y. pseudotuberculosis</i>		к ДА <i>Y. enterocolitica</i>	
		титр	логарифм	титр	логарифм
Бруцеллёзная		1:400	8,83±0,59	1:3200	11,03±0,32
Сальмонеллёзная АВСДЕ		–	–	–	–
Эшерихиозные	ОКА	1:1600	10,27±0,39	1:800	9,27±0,64
	ОКВ	1:800	9,40±0,67	1:400	8,61±0,46
	ОКС	1:100	6,99±0,30	1:50	5,62±0,13
	ОКД	–	–	–	–
	ОКЕ	1:800	9,62±0,63	1:400	8,96±0,49

Примечание – "–" – отрицательный результат; "n" – количество повторов.

Данные таблицы 6 свидетельствуют, что у ДА *Y. pseudotuberculosis* отмечаются меньшая неспецифическая реакция с бруцеллёзной сывороткой, чем у ДА *Y. enterocolitica*, но большие неспецифические реакции – с эшерихиозными сыворотками. У обеих фракций мы видим отрицательную реакцию с сальмонеллёзной сывороткой. Однако в целом набор неспецифических реакций сходен у двух фракций.

Для полной оценки специфической активности антигена необходимо провести изучение антител, полученных в результате иммунизации животных данным антигеном. Поэтому нами были получены гипериммунные сыворотки крови кроликов к ДА *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* для сравнительной оценки активности специфических антител, находящихся в них. Сыворотки получали пяти кратной иммунизацией кроликов с использованием ПАФ.

Сравнительная оценка чувствительности и специфичности экспериментальных гипериммунных сывороток, полученных к ДА

Y. pseudotuberculosis и *Y. enterocolitica*, проводилась в ИФА и представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Антительная активность экспериментальных сывороток

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

Примечание – "n" – количество кроликов в группе.

Как видно из представленных данных сыворотка, полученная к псевдотуберкулёзному ДА, проявила более высокую чувствительность, чем сыворотка к кишечной иерсиниозной ДА.

Обе сыворотки реагировали с клетками *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, что свидетельствует об их родовой специфичности (Таблица 7).

Нами дополнительно были проведены тесты на взаимодействие экспериментальных сывороток с клетками: энтеробактера, сальмонеллы, эшерихии, протей, серраций, бруцеллы. С данными бактериями титры в ИФА

были не высоки и составляли 1:200-1:400, что дополнительно указывает на родовую специфичность обеих сывороток.

Из результатов исследований, представленных в данном разделе диссертации, можно сделать следующие выводы:

1. Получен ДА *Y. pseudotuberculosis*, который обладает большей антигенной активностью, чем ДА *Y. enterocolitica*.

2. Экспериментальная гипериммунная сыворотка к ДА *Y. pseudotuberculosis*, проявила более высокую чувствительность, чем аналогичная сыворотка к ДА *Y. enterocolitica*.

3. ДА *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, а также антитела к ним обладают родовой специфичностью.

4. ДА *Y. pseudotuberculosis* и родственная ему гипериммунная сыворотка могут быть рекомендованы для создания диагностических тест-систем.

2.2.3. Использование ПААГ для иммунизации кроликов

ДА *Y. pseudotuberculosis*

Для определения оптимальной иммунизирующей дозы ДА *Y. pseudotuberculosis* кроликов разделили на 6 опытных и 6 контрольных групп по 5 кроликов в каждой группе. Животных каждой из 6 групп пятикратно иммунизировали одной из доз ДА: 0,2, 1, 2, 4, 8 или 16 мг/животное. Перед иммунизацией кроликам опытных групп антиген смешивали 1:1 с 1% раствором ПААГ (ДА+ПААГ), а кроликам контрольных групп – с физиологическим раствором (ДА+ФР). Полученные сыворотки крови исследовали при помощи ИФА в реакции с ДА *Y. pseudotuberculosis* (20 мкг/мл) (Таблица 8).

Таблица 8 – Результаты иммунизации кроликов различными дозами ДА *Y. pseudotuberculosis*

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

Примечание – "n" – количество кроликов в группе.

Как видно из таблицы 8, в контрольных группах рост титра антител прямо пропорционально связан с увеличением дозы ДА и количеством проведённых иммунизаций.

В опытных группах действие ПААГ отменяет зависимость величины титра антител от дозы ДА в интервале 2,0-16,0 мг/кролика, а при дозах 0,2-1

мг/кролика данная зависимость прослеживается не так ярко как в контрольных группах.

Использование ПААГ позволяет в опытных группах получать после 5 иммунизации сыворотки с более высоким титром антител, чем в контрольных: при иммунизации дозами ДА 0,2-2 мг/кролика значения титров сывороток опытной группы в 8 раз выше титра контрольной, дозой ДА 4 мг/кролика – в 4 раза, дозой ДА 8 мг/кролика – в 2 раза. Однако при значительной дозе ДА (16,0 мг/кролика) влияние ПААГ на величину титра антител отсутствует.

Наибольшую антительную активность имеют сыворотки крови, полученные от кроликов, иммунизированных ДА в дозах 2,0-16,0 мг/кролика с использованием ПААГ. Титры этих сывороток составили 1:409600.

Для гипериммунизации кроликов ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ в качестве основной иммунизирующей дозы следует применять 2 мг ДА/кролика, т.к. такая доза позволяет при незначительном расходе антигена получать гипериммунные сыворотки с высоким титром специфических антител. Однако следует отметить, что при использовании высоких доз ДА (16 мг/кролика) помощи адьюванта не требуется, т.к. в состав ДА *Y. pseudotuberculosis* входят белки, которые в концентрированных растворах агрегируют, повышая свою антигенность.

У кроликов, иммунизированных различными дозами ДА *Y. pseudotuberculosis*, после 5 иммунизации дополнительно исследовали кровь для подсчёта общего числа лейкоцитов (WBC), а также двух их разновидностей: лимфоцитов (L) и гранулоцитов (G) (Таблица 9).

Как видно из таблицы 9 на рост количества лейкоцитов влияло увеличение иммунизирующей дозы ДА *Y. pseudotuberculosis*, а также использование ПААГ. На лимфоциты ПААГ оказывает более выраженное стимулирующее действие, чем на гранулоциты.

Механизм действия ПААГ на антителогенез, по-видимому, связан в основном с увеличением скорости презентации антигена, дифференцировки лимфоцитов и в меньшей степени за счёт роста количества лимфоидных клеток.

О данном предположении свидетельствуют высокие титры специфических антител при относительно низком количестве лимфоцитов в крови.

Таблица 9 – Результаты определения количества лейкоцитов в крови кроликов, иммунизированных различными дозами ДА *Y. pseudotuberculosis*

Дозы ДА, мг/кролика	Количество лейкоцитов в крови кролика (10^9 клеток/литр), n = 5					
	ПААГ 1% (опыт)			ФР (контроль)		
	WBC	L	G	WBC	L	G
2	7,8±0,42	3,15±0,18	3,47±0,12	4,93±0,09	2,81±0,18	1,93±0,05
4	11,52±0,15	4,84±0,32	5,61±0,26	–	–	–
8	15,45±0,76	5,78±0,3	8,69±0,34	–	–	–
16	15,87±0,48	6,1±0,47	8,58±0,29	15,71±0,58	5,08±0,13	8,77±0,57

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

Оптимальную концентрацию ПААГ определяли иммунизацией 3 групп кроликов, которым инъецировали по 2 мг ДА *Y. pseudotuberculosis* в смеси с различными концентрациями ПААГ (0,2%, 1%, 5%) в соотношении 1:1. Кроликов иммунизировали по описанной выше схеме. Полученную после 5 иммунизации сыворотку крови исследовали ИФА в реакции с ДА *Y. pseudotuberculosis* (20 мкг/мл).

Сыворотки, полученные от кроликов иммунизированных с использованием 0,2% раствора ПААГ, имели титр 1:51200, 1% раствором ПААГ – 1:409600, 5% раствором ПААГ – 1:102400. Таким образом, оптимальной для иммунизации является 1% концентрация раствора ПААГ. Превышение данной концентрации в 5 раз (5% раствор ПААГ) сопровождается появлением запаха йода. Избыточное количество которого, по-видимому,

негативно влияет на свойства ДА и местную реакцию организма, что приводит к снижению титра специфических антител.

Специфичность сывороток, полученных после 5 иммунизации, изучали в ИФА с формализированными клетками бактерий. Результаты отражены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты определения специфичности сывороток крови кроликов, иммунизированных ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ

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

Примечание – "n" – количество кроликов в группе.

При исследовании специфичности кроличьи сыворотки крови, полученные с использованием ПААГ и ДА *Y. pseudotuberculosis*, показали высокие титры антител с клетками *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, а

также низкие титры с клетками других родов кишечной микрофлоры и бруцеллами, что свидетельствует о родовой специфичности данных сывороток.

По данному разделу можно сделать следующие выводы:

1. Использование ПААГ в комбинации с ДА *Y. pseudotuberculosis* позволяет получать гипериммунную кроличью сыворотку крови с высоким титром специфических антител.

2. Полученная гипериммунная сыворотка обладает иерсиниозной специфичностью.

3. Оптимальной иммунизирующей дозой для получения гипериммунной иерсиниозной сыворотки с использованием в качестве адьюванта ПААГ является доза 2 мг ДА *Y. pseudotuberculosis* на кролика.

4. Оптимальная концентрация раствора ПААГ при гипериммунизации кроликов ДА *Y. pseudotuberculosis* составляет 1%.

2.2.4. Использование ПААГ для иммунизации морских свинок

ДА *Y. pseudotuberculosis*

Нами также была изучена возможность получения гипериммунной сыворотки крови морской свинки с использованием ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ. Для этого нами было проведено 5 иммунизаций морских свинок. Расчёт иммунизирующей дозы для них был проведён с учётом коэффициента межвидового переноса доз из расчёта введения 2 мг вещества на кролика [10]. Иммунизирующая доза ДА *Y. pseudotuberculosis* для морской свинки составила 0,6 мг. ИФА полученной сыворотки с цельными клетками бактерий указал на родовую специфичность антительного препарата (Таблица 11). Взаимодействие с бактериями из других родов кишечной микрофлоры и бруцеллами было незначительным. Полученные ранее сходным путём кроличьи сыворотки имени более высокие титры антител с иерсиниозными клетками и похожую специфичность.

Таблица 11 – Результат определения специфичности полученной гипериммунной сыворотки крови морской свинки

Бактериальные клетки в разведении 10 ⁹ клеток/мл	Количество антител полученных сывороток с клетками бактерий	
	титры	двоичные логарифмы титров для n = 5
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:1	1:12800	13,16±0,45
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:3	1:12800	13,48±0,73
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:4	1:6400	12,29±0,89
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O:5	1:12800	13,34±0,79
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	1:12800	13,39±0,55
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	1:6400	12,01±0,92
<i>Escherichia coli</i>	1:200	7,87±0,45
<i>Salmonella typhimurium</i>	1:100	6,66±0,32
<i>Proteus vulgaris</i>	1:100	6,71±0,44
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1:200	7,19±0,14
<i>Brucella abortus</i>	1:100	6,77±0,59

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

Таким образом, морские свинки также могут быть использованы для получения диагностической иерсиниозной гипериммунной сыворотки крови, путём их иммунизации комплексом ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ.

2.2.5. Использование ЗНЧ для иммунизации кроликов

ДА энтеропатогенных иерсиний

Была исследована возможность использования ЗНЧ в качестве адьюванта для иммунизации животных в комплексе с ДА энтеропатогенных иерсиний.

В связи с тем, что значительных отличий по специфичности между ДА *Y. pseudotuberculosis* и ДА *Y. enterocolitica* в ранее проведённых исследованиях выявлено не было, нами в качестве иммуногена был использован ДА кишечной иерсиниозного микроба.

Исследования ЗНЧ в качестве адьюванта проводили на белых мышах. У иммунизированных животных определяли активность гуморального и клеточного иммунитета. Для изучения антителогенеза у мышей исследовали сыворотки крови в ИФА, а клеточную реакцию изучали по величине дыхательной активности перитонеальных макрофагов.

Были иммунизированы 6 групп мышей: 3 контрольных группы (ДА, ЗНЧ, ФСБ) и 3 опытных группы (ДА+ЗНЧ, ДА+ЗНЧ+ПАФ, ДА+ПАФ). ДА+ПАФ был использован в качестве препарата сравнения. Препараты мышам вводили внутрибрюшинно 2-хкратно. Для иммунизации использовали ДА *Y. enterocolitica* в дозе по белку 25 мкг на животное. В качестве адьювантов использовали: ЗНЧ, ЗНЧ+ПАФ, ПАФ.

Полученные сыворотки крови исследовали ИФА. Титры антител в сыворотках крови, полученных от мышей, иммунизированных по различным схемам, представлены в таблице 12.

Как видно из таблицы 12, ЗНЧ обладают адьювантными свойствами при использовании их в комплексе с ДА энтеропатогенных иерсиний. Однако действие их в 2 раза слабее, чем у ПАФ. Также можно отметить, что ЗНЧ способны усиливать адьювантные свойства ПАФ.

Таблица 12 – Результаты исследования сывороток крови мышей, иммунизированных ДА *Y. enterocolitica* с различными адьювантами

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

Примечание – "n" – количество мышей в группе.

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

Для уточнения механизма воздействия ЗНЧ на антителогенез определяли уровень цитокинов в крови иммунизированных животных. При помощи коммерческих иммуноферментных тест-систем определяли содержание интерферона- γ , интерлейкинов-1 β и 6.

Было установлено, что уровень интерферона- γ в группе ДА+ЗНЧ, был выше по сравнению с контролем в 1,8 раза, в группе ДА+ПАФ – в 2,3 раза, в группе ДА+ЗНЧ+ПАФ – в 2,7 раз.

Уровень интерлейкина-1 β в группе ДА+ЗНЧ, был выше по сравнению с контролем в 2, раза, в группе ДА+ПАФ – в 1,8 раза, в группе ДА+ЗНЧ+ПАФ – в 4 раза.

Уровень интерлейкина-6 в группе ДА+НЧЗ был выше по сравнению с контролем в 2 раза, в группе ДА+ПАФ – в 2,7 раза и в группе ДА+ЗНЧ+ПАФ – в 2,9 раза.

Таким образом, проведённые исследования указали на способность ЗНЧ к двукратному подъёму уровня цитокинов. Однако данная способность у ПАФ выражена в большей степени, что объясняет более высокое содержание антител в крови мышей, иммунизированных ДА+ПАФ.

В заключении первого этапа исследований следует сделать вывод, что двукратная иммунизация животных конъюгатом ДА+ЗНЧ целесообразна для стимуляции иммунитета. По нашему мнению, адьювантное действие конъюгированных с ДА ЗНЧ является следствием повышенной активации фагоцитирующих клеток, что приводит к улучшению презентации ДА антителообразующим клеткам.

На втором этапе исследований была выяснена возможность использования конъюгата ДА+ЗНЧ для получения гипериммунных сывороток крови кроликов. Для этого проводилась пятикратная подкожная иммунизация 3-х групп животных (Таблица 13). В качестве антигена также использовали ДА *Y. enterocolitica* количестве 30 мкг на животное. Невысокая доза ДА была взята нами намеренно для снижения его влияния на антителогенез и получения более чёткой картины стимулирующего действия адьювантов.

Полученную сыворотку крови исследовали ИФА. Результаты данного опыта представлены в таблице 13.

Из данных, приведённых в таблице 13, следует после 1-й и 2-й иммунизаций рост титра антител происходил в равной степени при использовании обоих адьювантов (ЗНЧ и ПАФ) и составил 1:6400. Однако после 2-й иммунизации прирост количества антител наблюдался только в группе ДА+ПАФ. ЗНЧ не обеспечивали достаточной стимуляции синтеза антител к ДА после 2-й иммунизации.

Таблица 13 – Результаты гипериммунизации кроликов ДА *Y. enterocolitica* с различными адъювантами

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

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

При использовании в качестве адъюванта ЗНЧ у животных в месте иммунизации не было отмечено чрезмерно высокой воспалительной реакции, и напротив, подкожное введение ПАФ сопровождалось возникновением болезненных длительное время сохраняющихся воспалительных очагов.

Была также исследована специфичность полученных гипериммунных сывороток в ИФА с бактериальными клетками. В исследовании использовали сыворотки, полученные после 5-й иммунизации (Таблица 14).

Полученные данные свидетельствуют о родовой специфичности всех полученных сывороток, что характерно для ДА. Однако при использовании в качестве адъюванта ЗНЧ наблюдается некоторое повышение видовой специфичности сывороток (Таблица 14).

Таблица 14 – Результаты определения специфичности полученных гипериммунных сывороток

Бактериальные клетки в разведении 10^9 клеток/мл	Использованные для иммунизации адьюванты и антигены					
	ДА+ЗНЧ		ДА+ ПАФ		ДА (контроль)	
	Титры антител полученных сывороток к ДА <i>Y. enterocolitica</i> / двоичные логарифмы титров антител для n = 5					
	титр	логарифм	титр	логарифм	титр	логарифм
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1:1600	10,8±0,63	1:6400	12,76±0,93	1:400	8,42±0,43
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1:800	9,85±0,32	1:6400	12,41±0,58	1:400	8,68±0,49
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i>	1:100	6,6±0,23	1:400	8±0,33	–	–
<i>Proteus vulgaris</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Enterobacter aerogenes</i>	–	–	1:400	8,86±0,55	–	–

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

По данному разделу исследований можно сделать следующие выводы:

1. Золотые наночастицы стимулируют клеточный иммунитет, увеличивают образование специфических антител, способствуют синтезу лимфокинов, оказывают щадящее действие на ткани в месте введения, что позволяет использовать их в качестве адьюванта при однократных и двухкратных иммунизациях животных.

2 Золотые наночастицы не обеспечивают достаточной стимуляции синтеза антител к ДА *Y. enterocolitica* при многократной иммунизации животных, что не позволяет использовать их для гипериммунизаций с ДА энтеропатогенных иерсиний.

2.2.6. Применение антител, полученных к ДА *Y. pseudotuberculosis*, для создания иммуноферментной тест-системы

Была создана иммуноферментная тест-система для индикации иерсиний непрямым методом. В тест-системе использовались сыворотки крови, полученные гипериммунизацией кроликов и морских свинок препаратом ДА *Y. pseudotuberculosis* в комплексе с ПААГ. Для индикации иерсиний в данной тест-системе сыворотка морской свинки адсорбировалась на поверхности лунок, а кроличья сыворотка выявляла уже адсорбированный на первой сыворотке антиген. Сыворотки использовали в разведении 1:200. Чувствительность и специфичность созданной тест-системы определяли в ИФА с клетками штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, полученных из музейной коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб", а также с культурами иерсиний, выделенными от сельскохозяйственных животных. Для выявления неспецифических реакций тест-системы дополнительно проводили ИФА с бактериями из других родов бактерий кишечной группы. В качестве препаратов сравнения в ИФА использовали коммерческие сыворотки, извлечённые из наборов для РНГА. Результаты испытания представлены в таблице 15.

Иммуноферментная тест-система, созданная на основе антител к ДА *Y. pseudotuberculosis*, проявила высокую чувствительность и родовую специфичность со всеми штаммами иерсиний и не взаимодействовала с бактериями из других родов, что позволяет использовать её в диагностических целях. Количество выявляемых тест-системой иерсиний составляло 10^7 - 10^8 клеток/мл. Гипериммунная сыворотка крови кролика, используемая в данной тест-системе, показала более высокую активность в сравнении с коммерческими антительными препаратами.

Таблица 15 – Результаты определения чувствительности и специфичности иммуноферментной тест-системы с цельными клетками иерсиний

Бактериальные клетки		Сыворотки полученные		
		после иммунизации кроликов ДА У.р.	из коммерческих наборов для РНГА	
штаммы	серо-варианты		псевдо-туберкулёзного	кишечно-иерсиниозного О:3
		Количество бактерий, выявляемое сывороткой разведённой 1:200		
Музейные штаммы иерсиний				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	О:1	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	О:3	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV	О:4	10 ⁷	10 ¹⁰	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> V	О:5	10 ⁸	10 ¹⁰	–
<i>Y. enterocolitica</i> 66-82	О:3	10 ⁷	–	10 ⁹
<i>Y. enterocolitica</i> 383	О:9	10 ⁸	–	–
Штаммы иерсиний, выделенные от животных				
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 40	О:3	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 67	О:3	10 ⁷	10 ⁹	–
<i>Y. enterocolitica</i> 12	О:3	10 ⁷	–	10 ⁹
<i>Y. enterocolitica</i> 58	О:3	10 ⁷	–	10 ⁹
Штаммы бактерий из других родов кишечной группы				
<i>Escherichia coli</i> 4295		–	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i> 1626		–	–	–
<i>Proteus vulgaris</i> 19		–	–	–
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC-13048		–	–	–

Примечание – "–" – отрицательный результат.

На втором этапе испытаний мы применили созданной тест-системы для индикации возбудителей псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза в средах накопления: 1%-й ЗПВ и ФСБ. В среды предварительно вносили фекалии свиней с различным содержанием *Y. pseudotuberculosis* или *Y. enterocolitica*. "Холодовое обогащение" обсеменённых иерсиниями сред накопления проводили в течение 3 и 6 суток. Гипериммунную сыворотку в тест-системе использовали в разведениях 1:200 и 1:1600, чтобы установить её рабочую концентрацию. Исследования проводили с неразведёнными средами накопления (цел.) и с их двух кратными разведениями, что позволило оценить степень накопления иерсиний и проследить зависимость изменение оптической плотности от разведения содержимого лунки. Положительным считали результаты ИФА, превышающие по оптической плотности отрицательные контроли в 2 и более раз (Таблица 16).

Как видно из таблицы 16, присутствие иерсиний в средах накопления обнаруживалось тест-системой уже на 3 день "холодового обогащения". Минимальное количество вносимых в среду иерсиний, необходимое для их обнаружения на 3 день, составляло 50 клеток/мл, а на 6 сутки – 5 клеток/мл. Однако, в 1%-й ЗПВ разведения с положительными результатами имеют более высокие значения, чем в ФСБ. Это свидетельствует о более интенсивном накоплении иерсиний на данной среде. Посторонняя микрофлора, находящаяся в свиных фекалиях, незначительно снижает эффективность индикации иерсиний данной тест-системой. Рабочим разведением диагностической сыворотки в тест-системе можно считать 1:200.

Таблица 16 – Чувствительность экспериментальной иммуноферментной тест-системы со средами накопления на 3-и и 6-е сутки "холодового обогащения" их *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*

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

Примечание – ** – контроль без фекалий, но с добавлением *Y. pseudotuberculosis* в количестве 5×10^5 клеток/мл среды.

По данному разделу исследований можно сделать следующие выводы:

1. Иммуноферментная тест-система, созданная на основе антител к ДА *Y. pseudotuberculosis*, проявила специфичность к клеткам *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* и позволила выявлять данные микроорганизмы в концентрации 10^7 - 10^8 клеток/мл.

2. Количество иерсиний, вносимых с фекалиями в среду накопления, для уверенной индикации их иммуноферментной тест-системой на 3 сутки "холодового обогащения" составляло 50 клеток/мл среды, а на 6 сутки – 5 клеток/мл.

2.2.7. Индикация псевдотуберкулёзного и кишечной иерсиниозного микробов бактериологическим методом у сельскохозяйственных животных

Для подтверждения возможности совместной циркуляции *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* у сельскохозяйственных животных были проведены бактериологические исследования фекалий молодняка свиней и КРС. Исследованию подверглись 360 поросят и 400 телят 2-6 месячного возраста из 11 животноводческих хозяйств, расположенных в 7 районах Саратовской области: Аткарском, Базарно-Карабулакском, Екатериновском, Новобурасском, Петровском, Саратовском, Татищевском. Исследования проводили в осенне-зимне-весенний период, что связано с психрофильностью энтеропатогенных иерсиний. Фекалии из прямой кишки подвергали "холодовому обогащению" в ФСБ, щелочной обработке и высеву на среду Эндо. Результаты исследований представлены в таблице 17.

В 3 животноводческих хозяйствах было выделено 9 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 11 штаммов *Y. enterocolitica*. Псевдотуберкулёзный микроб высевался от свиней в 2,5% случаев, а от КРС – в 2,25% случаев. Кишечноиерсиниозный микроб был обнаружен у 3,1% свиней и у 2,75% КРС. Таким образом, количество заражённых энтеропатогенными иерсиниями поросят составило 5,56%, а телят – 5%. Совместная циркуляция двух видов иерсиний

Таблица 17 – Циркуляция *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* у сельскохозяйственных животных в некоторых районах Саратовской области

Хозяйство и район области	Обследованные животные	Выделенные штаммы
1	2	3
СПХ "Озёрное", с. Озерное Аткарского района	80 свиней	<i>Y. enterocolitica</i> : А-С-2, А-С-33, А-С-50, А-С-51, А-С-67
	40 телят	<i>Y. enterocolitica</i> : А-К-6, А-К-9 <i>Y. pseudotuberculosis</i> : А-К-18, А-К-40
СПХ "СХА Дружба", с. Казанла Базарно-Карабулакского района	80 свиней	<i>Y. enterocolitica</i> : БК-С-11, БК-С-21, БК-С-22, БК-С-42
	40 телят	<i>Y. pseudotuberculosis</i> : БК-К-32, БК-К-36, БК-К-38
ООО "Феникс", с. Старые Бурасы Базарно-Карабулакского района	80 свиней	–
СХПК "Крутоярское", с. Крутояр Екатериновского района	40 телят	<i>Y. pseudotuberculosis</i> : Е-К-15, Е-К-24, Е-К-28, Е-К-38
ООО "Андреевка", с. Андреевка Екатериновского района	40 телят	–
КФХ "Гадисов А.Г.", с. Лох Новобурасского района	40 телят	–
СПК "Надежда", с. Ионычёвка Петровского района	40 телят	–
СПК "Нива", с. Кожевино Петровского района	40 телят	–
ООО "СХП Дубковское", п. Дубки Саратовского района	40 телят	–
ООО "Ягоднополянское", с. Ягодная Поляна Татищевского района	80 свиней	–
	40 телят	–
КФХ "Аванесян А.А.", п. Светлый Татищевского района	40 свиней	–
	40 телят	–
Итого:	360 свиней 400 телят	<i>Y. pseudotuberculosis</i> – 9 <i>Y. enterocolitica</i> – 11

Примечание – "–" – иерсиний выделено не было.

обнаружена в СПХ "Озёрное", с. Озерное Аткарского района. В данном хозяйстве рекомендовано тестировать экспериментальную диагностическую систему.

Серотипирование выделенных штаммов иерсиний проводили при помощи О-моновалентных сывороток производства производства ФГУН НИИЭМ им. Пастера. Результаты представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Серотипирование выделенных штаммов иерсиний

Штаммы иерсиний	Сыворотки О-моновалентные			
	псевдотуберкулёзные		кишечноиерсиниозные	
	О:1	О:3	О:3	О:9
<i>Y. pseudotuberculosis</i>				
А-К-18	–	+	–	–
А-К-40	–	+	–	–
БК-К-32	–	+	–	–
БК-К-36	–	+	–	–
БК-К-38	–	+	–	–
Е-К-15	–	–	–	–
Е-К-24	–	+	–	–
Е-К-28	–	+	–	–
Е-К-38	–	–	–	–
<i>Y. enterocolitica</i>				
А-С-2	–	–	+	–
А-С-33	–	–	+	–
А-С-50	–	–	+	–
А-С-51	–	–	+	–
А-С-67	–	–	+	–
А-К-6	–	–	+	–
А-К-9	–	–	+	–
БК-С-11	–	–	+	–
БК-С-21	–	–	+	–
БК-С-22	–	–	+	–
БК-С-42	–	–	+	–

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

Для индикации у выделенных иерсиний плазмиды вирулентности с ними были проведены следующие тесты: агглютинация с диагностической сывороткой к вирулентным *Y. enterocolitica*, аутоагглютинация, пигментсорбция, температурозависимость роста колоний (Таблица 19).

Таблица 19 – Вирулентность выделенных штаммов иерсиний

Штаммы иерсиний	Тесты для определения вирулентности			
	Агглютинация СВИ	Аутоагглютинация	Пигментсорбция	Температурозависимость морфологии колоний
<i>Y. pseudotuberculosis</i>				
А-К-18	н.д.	+	+	+
А-К-40	н.д.	+	+	+
БК-К-32	н.д.	+	+	+
БК-К-36	н.д.	+	+	+
БК-К-38	н.д.	+	+	+
Е-К-15	н.д.	+	–	+
Е-К-24	н.д.	+	–	+
Е-К-28	н.д.	+	–	+
Е-К-38	н.д.	+	–	+
<i>Y. enterocolitica</i>				
А-С-2	+	+	+	+
А-С-33	+	+	+	+
А-С-50	+	+	+	+
А-С-51	+	+	+	+
А-С-67	+	+	+	+
А-К-6	+	+	+	+
А-К-9	+	+	+	+
БК-С-11	+	+	+	+
БК-С-21	–	+	+	+
БК-С-22	–	+	+	+
БК-С-42	+	+	+	+

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

Из таблицы 14 видно, что все иерсинии обладали вирулентностью.

2.2.8. Испытание созданной иммуноферментной тест-системы на сельскохозяйственных животных

В СПХ "Озёрное", с. Озерное Аткарского района было проведено испытание иммуноферментной тест-системы на молодняке сельскохозяйственных животных: свиньях и телятах в возрасте – 3-4 месяцев. Первый этап испытания предполагал исследование свиней (Таблица 20). На втором этапе был исследован КРС (Таблица 21).

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

Следует отметить, что в целях безопасности исследуемый материал подвергался обеззараживанию 1%-м раствором формалина 4 часа при комнатной температуре. В тест-системе использовали экспериментальную гипериммунную сыворотку в разведении 1:200. Положительным считался результат ИФА в случае превышения значения оптической плотности содержимого лунки в 2 раза по сравнению со значениями оптической плотности отрицательного контроля.

Бактериологический анализ сред накопления включал в себя отбор подозрительных колоний с характерными для *Y. pseudotuberculosis* (Y. p.) и *Y. enterocolitica* (Y. e.) культуральными признаками на 3 и 6 сутки "холодового обогащения", микроскопии выделенных чистых культур бактерий и изучении

их биохимических признаков. Похожесть микробных колоний иерсиний и кокков приводила к отбору большого количества ложнохарактерных колоний. Часто с одной чашки приходилось отбирать по 2-4 колонии, что конечно повышало трудоёмкость и затратность бактериологического метода диагностики. Однако отрицательные результаты ИФА на 3 сутки в таких пробах позволяли при повторном исследовании на 6 сутки уже менее тщательно исследовать такие пробы и сократить количество отбираемых колоний (Таблицы 20 и 21).

Результаты исследования свиного поголовья приведены в таблице 20.

Таблица 20 – Индикация энтеропатогенных иерсиний в фекалиях поросят при помощи экспериментальной тест системы и бактериологического исследования

№№ проб	Время обогащения, сутки							
	3				6			
	Бактериологическое исследование			ИФА, единицы оптической плотности	Бактериологическое исследование			ИФА, единицы оптической плотности
	Кол-во отобранных колоний	Выделенные штаммы иерсиний			Кол-во отобранных колоний	Выделенные штаммы иерсиний		
У. р.		У. е.	У. р.	У. е.				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0	–	–	0,091	0	–	–	0,100
2	3	–	–	0,083	2	–	–	0,097
3	4	–	–	0,102	2	–	–	0,115
4	1	–	–	0,098	1	–	–	0,116
5	3	–	–	0,109	2	–	–	0,119
6	2	–	–	0,221	4	+	–	0,352
7	0	–	–	0,086	0	–	–	0,096
8	2	–	–	0,112	2	–	–	0,123
9	4	–	–	0,093	2	–	–	0,099
10	2	–	–	0,081	1	–	–	0,092
11	2	–	–	0,105	1	–	–	0,113
12	1	–	–	0,095	1	–	–	0,101
13	0	–	–	0,086	0	–	–	0,089
14	3	–	–	0,127	2	–	–	0,134

Продолжение таблицы

15	2	-	-	0,097	2	-	-	0,109
16	1	-	-	0,111	1	-	-	0,123
17	2	-	-	0,089	1	-	-	0,095
18	3	-	-	0,126	2	-	-	0,129
19	0	-	-	0,094	0	-	-	0,098
20	2	-	+	0,199	1	-	+	0,264
21	3	-	-	0,119	2	-	-	0,127
22	1	-	-	0,082	1	-	-	0,096
23	1	-	-	0,117	1	-	-	0,128
24	4	-	-	0,094	2	-	-	0,113
25	0	-	-	0,120	0	-	-	0,131
26	2	-	-	0,217	4	-	+	0,273
27	2	-	-	0,121	2	-	-	0,139
28	2	-	-	0,084	2	-	-	0,090
29	4	-	-	0,104	2	-	-	0,109
30	0	-	-	0,103	0	-	-	0,116
31	2	-	-	0,090	2	-	-	0,098
32	2	-	-	0,089	1	-	-	0,094
33	0	-	-	0,119	0	-	-	0,128
34	0	-	-	0,099	0	-	-	0,103
35	0	-	-	0,108	0	-	-	0,118
36	3	-	-	0,084	2	-	-	0,097
37	2	-	-	0,103	1	-	-	0,110
38	1	-	+	0,230	1	-	+	0,317
39	4	-	-	0,087	2	-	-	0,096
40	2	-	-	0,100	1	-	-	0,109
41	3	-	-	0,093	2	-	-	0,099
42	0	-	-	0,098	0	-	-	0,105
43	1	-	-	0,083	1	-	-	0,089
44	4	-	-	0,114	2	-	-	0,121
45	0	-	-	0,112	1	-	-	0,118

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

Как видно из таблицы 20, бактериологическим и серологическим методами было исследовано 45 проб фекалий от свиней.

Изучение посевов на среде Эндо после 3-х суток "холодового обогащения" позволило отобрать 80 колоний, сходных по морфологии с иерсиниозными колониями, из которых было выделено 2 штамма энтеропатогенных иерсиний, т.е. на 1 выделенный штамм иерсиний приходилось 39 колоний не иерсиниозной природы, что подтверждает мнение о значительной трудоёмкости бактериологического метода исследований.

Серологическое исследование, проводимое в комплексе с бактериологическим методом, позволило уменьшить количество колоний, отбираемых после 6-ти суток "холодового обогащения, до 59 штук, переводя внимание исследователя на положительно реагирующие в ИФА пробы фекалий, что значительно снизило трудоёмкость исследований.

Серологический метод диагностики позволил обнаружить дополнительно 2 штамма энтеропатогенных иерсиний, которые не удалось выделить в результате значительной загрязнённости среды накопления посторонней микрофлорой. В данном случае "холодовое обогащение" на бедной питательной среде, щелочная обработка перед посевом, не смогли повысить эффективность бактериологического метода, и только серологическое исследование среды накопления позволило выявить у животного циркуляцию иерсиний.

В процессе бактериологического исследования выявлена одновременная циркуляция у свиней в данном животноводческом хозяйстве псевдотуберкулёзного и кишечной иерсиниозного микробов при относительно невысокой обсеменённости поголовья животных, что делает перспективным применение диагностического препарата, ориентированного на выявление двух видов иерсиний.

Экспериментальная диагностическая иммуноферментная система позволила выявлять энтеропатогенных иерсиний двух видов в фекалиях свиней на 3-е и 6-е сутки их "холодового обогащения". Все случаи выделения иерсиниозных культур подтверждены положительными реакциями тест-системы. ИФА удалось дополнительно выявить две пробы энтеропатогенных

иерсиний, т.е. в данном случае эффективность применения тест-системы превысила эффективность бактериологического метода на 50%.

Результаты исследования телят представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Индикация энтеропатогенных иерсиний в фекалиях телят при помощи экспериментальной тест-системы и бактериологического исследования

№№ проб	Время обогащения, сутки							
	3				6			
	Бактериологическое исследование		ИФА, единицы оптической плотности	Бактериологическое исследование		ИФА, единицы оптической плотности		
	Кол-во отобранных колоний	Выделенные штаммы иерсиний		Кол-во отобранных колоний	Выделенные штаммы иерсиний			
У. р.		У. е.	У. р.		У. е.			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2	–	–	0,101	1	–	–	0,107
2	0	–	–	0,087	0	–	–	0,094
3	4	–	–	0,096	2	–	–	0,105
4	1	–	–	0,093	1	–	–	0,099
5	2	–	+	0,221	1	–	+	0,297
6	0	–	–	0,115	0	–	–	0,121
7	1	–	–	0,104	0	–	–	0,110
8	3	–	–	0,099	2	–	–	0,104
9	2	–	–	0,092	2	–	–	0,097
10	3	–	–	0,083	2	–	–	0,090
11	1	–	–	0,093	1	–	–	0,099
12	0	–	–	0,106	0	–	–	0,111
13	0	–	–	0,088	0			0,094
14	1	–	+	0,218	1	–	+	0,271
15	1	–	–	0,097	1	–	–	0,102
16	4	–	–	0,098	2	–	–	0,102
17	2	–	–	0,103	2	–	–	0,109
18	2	–	–	0,096	1	–	–	0,104
19	0	–	–	0,084	0	–	–	0,087
20	1	–	–	0,082	1	–	–	0,085
21	1	–	–	0,247	3	+	–	0,363

Продолжение таблицы

22	2	-	-	0,112	1	-	-	0,118
23	2	-	-	0,109	1	-	-	0,116
24	0	-	-	0,092	0	-	-	0,098
25	3	-	-	0,099	2	-	-	0,107
26	1	-	-	0,096	1	-	-	0,100
27	0	-	-	0,084	0	-	-	0,092
28	0	-	-	0,091	0	-	-	0,098
29	0	-	-	0,085	0	-	-	0,089
30	2	-	-	0,258	4	+	-	0,388
31	4	-	-	0,100	2	-	-	0,107
32	2	-	-	0,093	2	-	-	0,099
33	3	-	-	0,106	2	-	-	0,113
34	0	-	-	0,097	0	-	-	0,103
35	1	-	-	0,098	1	-	-	0,107
36	2	-	-	0,091	1	-	-	0,095
37	2	+	-	0,264	2	+	-	0,391
38	1	-	-	0,084	1	-	-	0,086
39	0	-	-	0,090	0	-	-	0,097
40	1	-	-	0,095	1	-	-	0,102
41	1	-	-	0,092	0	-	-	0,096
42	4	-	-	0,106	2	-	-	0,111
43	1	-	-	0,083	0	-	-	0,092
44	0	-	-	0,178	0	-	-	0,233
45	0	-	-	0,111	0	-	-	0,119
46	2	-	-	0,097	1	-	-	0,105
47	1	-	-	0,099	1	-	-	0,104
48	3	-	-	0,107	2	-	-	0,114
49	2	-	-	0,097	1	-	-	0,103
50	1	-	-	0,088	1	-	-	0,093
51	4	-	-	0,113	2	-	-	0,120
52	2	-	-	0,093	2	-	-	0,100
53	0	-	-	0,109	0	-	-	0,117
54	2	-	-	0,095	1	-	-	0,099

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

Выводы, которые можно сделать, анализируя результаты, приведённые в таблице 21, во многом совпадают с выводами, сделанными при аналогичном исследовании свиней. В группе из 54 телят отмечена одновременная циркуляция *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Оба микроба успешно выявляются экспериментальной тест-системой, эффективность, которой превышает эффективность бактериологического метода на 50%.

По данному разделу проведённых исследований можно сделать общие выводы:

1. Выявлена возможность одновременной циркуляции у свиней и телят в одном животноводческом хозяйстве *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*

2. Экспериментальная иммуноферментная тест-система позволяет выявлять *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* у свиней и телят на 3-й и 6-й дни "холодового обогащения" в ФСБ с фекалиями исследуемых животных.

3. Все выделения энтеропатогенных иерсиний от сельскохозяйственных животных подтверждены положительными результатами серологических исследований.

4. Эффективность применения тест-системы на 3 день "холодового обогащения" превысила эффективность бактериологического метода на 50%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы получен ДА *Y. pseudotuberculosis*. Он оказался более антигенно активным, чем *Y. enterocolitica*. Преобладающими в данном антигене являются белки с молекулярными массами: 20, 45, 38, 17 кДа. Синтез антител в ДА *Y. pseudotuberculosis* провоцируют белки с молекулярными массами: 28, 32, 38, 45 кДа.

Была получена гипериммунная сыворотка к ДА *Y. pseudotuberculosis*, которая проявила более высокую чувствительность, чем аналогичная сыворотка к ДА *Y. enterocolitica*. Экспериментальная гипериммунная сыворотка крови, полученная к ДА *Y. pseudotuberculosis* обладала родовой специфичностью.

Нами также была изучена возможность получения гипериммунной кроличьей сыворотки крови с использованием ПААГ в комбинации с ДА *Y. pseudotuberculosis*. С помощью данного адъювантно-антигенного комплекса удалось получить гипериммунные сыворотки крови кроликов и морских свинок с высоким титром специфических антител. В ходе эксперимента была определена оптимальная иммунизирующая доза ДА *Y. pseudotuberculosis* и концентрация ПААГ при совместном использовании данных препаратов. Доза ДА составила 2 мг на кролика, а концентрация ПААГ – 1%.

Перспективность комплексного применения ЗНЧ и ДА *Y. enterocolitica* при гипериммунизации была оценена на кроликах. В ходе проведённого эксперимента установлено, что усиление антителогенеза и синтез лимфокинов происходят под действием ЗНЧ на протяжении первых двух иммунизаций, а затем данные показатели снижаются, что затрудняет использование комплекса ЗНЧ + ДА в гипериммунизациях.

Иммуноферментная тест-система, созданная на основе антител к ДА *Y. pseudotuberculosis*, проявила специфичность к клеткам *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* и позволила выявлять данные микроорганизмы в концентрации 10^7 - 10^8 клеток/мл. Количество иерсиний, вносимых с фекалиями в среду накопления, для уверенной индикации их иммуноферментной тест-системой на

3 сутки "холодового обогащения" составляло 50 клеток/мл среды, а на 6 сутки – 5 клеток/мл.

Для испытания созданной иммуноферментной системы на сельскохозяйственных животных было предварительно проведено бактериологическое обследование свиней и телят в животноводческих хозяйствах Саратовской области на возможность циркуляции у них энтеропатогенных иерсиний. В результате выявлена возможность одновременной циркуляции у свиней и телят *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*.

Последующее испытание экспериментальной тест-системы в неблагополучном по иерсиниозам хозяйстве показало на возможность индикации с её помощью *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* у свиней и телят на 3-й и 6-й дни "холодового обогащения". Все выделения иерсиний из фекалий животных были подтверждены положительными результатами экспериментальной тест-системы. Эффективность применения тест-системы превысила эффективность бактериологического метода на 50%.

Таким образом, проведённые исследования позволили создать родоспецифическую иммуноферментную тест-систему для одновременной индикации возбудителей псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза у сельскохозяйственных животных, которая позволила повысить эффективность бактериологического метода. В данной тест-системе нами использованы гипериммунные сыворотки крови, полученные от лабораторных животных, иммунизированных ДА *Y. pseudotuberculosis* в комплексе с ПААГ. Дополнительно нами изучена возможность применения ЗНЧ для получения гипериммунных сывороток к ДА иерсиний

ВЫВОДЫ

По проделанной исследовательской работе можно сделать выводы.

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

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

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

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

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

"холодового обогащения" составляло 50 клеток/мл среды, а на 6 сутки – 5 клеток/мл.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

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

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

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БСА – бычий сывороточный альбумин
ДА – диметилсульфоксид-антиген
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксинуклеиновая кислота
ЗПВ – забуференная пептонная вода
ЗНЧ – золотые наночастицы
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИФА – иммуноферментный анализ
КББ – карбонатно-бикарбонатный буферный раствор
кДа – килодальтон
КДО – кето-3-дезоксиктоновая кислота
КРС – крупный рогатый скот
ЛПС – липополисахарид
МДа – мегадальтон
м.к./мл – микробных клеток в миллилитре
МР – методические рекомендации
МУ, МУК – методические указания
МФА – метод флуоресцирующих антител
ОРА – ориентировочная реакция агглютинации
ПААГ – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода
ПАФ – полный адьювант Фрейнда
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РА – реакция агглютинации
РКоА – реакция коагглютинации
РЛА – реакция латексной агглютинации
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
СВИ – сыворотка к вирулентным иерсиниям
тыс. об./мин. – тысяч оборотов в минуту

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

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

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЦФБ – цитратно-фосфатный буферный раствор

ЕСА – общий антиген энтеробактерий

Ig – иммуноглобулины

pYV – плазида вирулентности иерсиний

Yop – белки наружной мембраны иерсиний

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адъюванты в современной вакцинологии / Е. Ю. Исаенко, Е. М. Бабич, И. В. Елисеева [и др.]. // J. Annals of Mechnikov Institute. – 2013. – № 4. – С. 5-21.
2. Аллергенные свойства конъюгата овальбумина с сополимером акриловой кислоты и N-винилпирролидона / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, И. С. Гушин и [и др.]. // Докл. АН СССР. – 1985. – № 6 (285). – С. 1513-1516.
3. Антигенные свойства пикратов полиоснований / Р. В. Петров, В. П. Евдаков, Р. М. Хаитов [и др.]. // Докл. АН СССР. – 1977. – № 5 (236). – С. 1260-1263.
4. 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.
5. Бургасова, О. А. Сравнительная оценка различных иммунологических реакций в диагностике псевдотуберкулеза / О. А. Бургасова, Л. Б. Куляшова, Г. Я.Ценёва // ЖМЭИ. – 1996. – № 2. – С. 48-51.
6. 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 / М. М. Вакараева. – Оболенск, 2015. – 22 с.
7. Взаимодействие молекул полииона с плазматической мембраной лимфоцитов, различающихся плотностью заряженных групп на клеточной поверхности / Р. И. Атауллаханов, Р. М. Хаитов, Р. В. Петров [и др.]. // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1984. – № 5. – С. 588-590.

8. Влияние синтетических полиамфолитов на взаимодействие Т- и В-лимфоцитов / В. П. Евдаков, В. А. Кабанов, Е. В. Кожина [и др.]. // Докл. АН СССР. – 1975. – № 2 (224). – С. 464-467.
9. 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.
10. 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. – № 1 (10). – С. 19-28.
11. ГОСТ ISO 10273-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения условно-патогенной бактерии *Yersinia enterocolitica*. – Введ. 2015-07-01. – М.: Стандартиформ, 2014. – 23 с.
12. Действие синтетического адъюванта на формирование иммунной реакции / С. В. Савина, С. В. Иващенко, В. М. Скорляков, В. С. Муртаева // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 8 (50). – С. 42-44.
13. Дзадзиева, М. Ф. Антигены псевдотуберкулезного микроба: автореф. дис. д-ра. биол. наук: 03.00.07 / М. Ф. Дзадзиева. – Москва, 1981. – 37 с.
14. Дифференциальная диагностика бруцеллеза и иерсиниоза и меры по их профилактике. Рекомендации, утверждённые Министерством сельского хозяйства и продовольствия РСФСР от 31.12.1991 г – Москва, 1991. – 8 с.
15. Езепчук, Ю. В. Патогенность, как функция биомолекул / Ю. В. Езепчук. – М.: Медицина, 1985. – 240 с.
16. 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. – № 10 (17). – С. 1172-1176.

17. Зыкин, Л. Ф. Иерсиниоз и псевдотуберкулез сельскохозяйственных животных / Л. Ф. Зыкин, А. А. Щербаков, З. Ю. Хапцев. – Саратов, 2002. – 67 с.
18. Иванова, А.С. Механизмы адъювантных эффектов полиоксидония / А. С. Иванова, Н. Г. Пучкова, А. В. Некрасов [и др.]. / Иммунология гемопозза. – 2015. – № 2 (13). – С. 30-92.
19. 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.
20. Иерсинии и иерсиниозы / под ред Г. Я. Ценёвой // Эпидемиологические аспекты псевдотуберкулёза и иерсиниоза в России / М. В. Чеснокова [и др.]. – С.-Пб., 2006. – С. 35-54.
21. Иммунология псевдотуберкулёза / Г. П. Сомов, Н. Н. Беседнова, М. Ф. Дзадзиева, Н. Ф. Тимченко. – М.: Изд-во "Наука", 1985. – 183 с.
22. 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.
23. 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.
24. Каримова, Л. Х. Вакцины против COVID-19 и адъюванты, улучшающие их свойства / Л. Х. Каримова // National Pharmaceutical Journal. – 2021. – <https://npjtoday.com>.

25. Киселёва, И. С. Мясо как фактор передачи инфекции при иерсиниозе: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.07 / И. С. Киселёва. – Саратов, 2005. – 27 с.
26. Клинические испытания первой отечественной анти-ВИЧ/СПИД-вакцины / Р. М. Хаитов, А. В. Решетников, И. Г. Сидорович [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 672 с.
27. Королюк, А. М. Реакция непрямой гемагглютинации при псевдотуберкулезе (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадке) / А. М. Королюк // ЖМЭИ. – 1969. – № 1. – С. 121-125.
28. Кравцов, А. Л. Влияние иммуномодуляторов на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуберкулезного вакцинного процесса / А. Л. Кравцов, С. Н. Ключева, С. А. Бугоркова / Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – № 3 (88). – С. 94-101.
29. Кукушкин, Ю. Н. Диметилсульфоксид – важнейший апротонный растворитель / Ю. Н. Кукушкин // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 9. – С. 54-59.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Мальянова, О. А. Эффективность обнаружения возбудителя псевдотуберкулеза в различных вариантах иммуноферментного анализа /

- О. А. Мальянова [и др.]. // Пробл. особо опасн. инфекц. – Саратов. – 1995. – № 1 (77). – С. 177-183.
34. 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.
35. Методические указания по лабораторной диагностике иерсиниоза животных и обнаружению возбудителя болезни в мясном сырье, молоке и растительных кормах, утверждённые Управлением ветеринарии Федерального агентства по сельскому хозяйству от 3.10.2005 г № 5-1-114/971. – Москва, 2005. – 20 с.
36. 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.
37. 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.
38. Новый принцип создания искусственных иммуногенов / В. А. Кабанов, Р. В. Петров, Р. М. Хаитов [и др.]. // ЖВХО им. Д. И. Менделеева. – 1982. – № 4 (27). – С. 417-428.
39. 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. – № 5 (263). – С. 1277-1280.
40. Оводов, Ю. С. Липополисахариды псевдотуберкулёзного микроба / Ю. С. Оводов, Р. П. Горшкова // – Химия природных соединений. – 1988. – № 2. – С. 163-171.

41. Определитель бактерий Берджи: пер. с англ. В 2 т. Т. 1 / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
42. Осипчук, Е. С. Молоко как фактор передачи возбудителя кишечного иерсиниоза: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.07 / Е. С. Осипчук . – Саратов, 2003. – 18 с.
43. 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. – № 5 (59). – С. 103-106.
44. Оценка специфичности гипериммунной сыворотки крови кроликов, полученной к ДМСО-антигену / А. Хаджу, С. В. Иващенко, Я. Б. Древо [и др.]. // Научное обозрение. – 2015. – № 5. – С. 35-39.
45. Пат. 2000004 Российская Федерация, МПК C08F226/10, A61K31/79, A61P37/02. Сополимеры 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, обладающие иммуностимулирующим действием / С. А. Кедик, Е. К. Федоров, В. И. Свергун [и др.]. // патентообладатель фармацевтическая фирма "Ковидон"– № 05054762; заявл. 16.07.1992; опубл. 15.02.1993, Бюл. № 6.
46. Пат. 2593012 Российская Федерация, МПК A61K39/00. Полимерный адьювант – антиген-носитель для вакцин / В. М. Скорляков, С. В. Савина, Д. А. Заярский, М. В. Трубкина; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО Саратовский ГАУ им. Н. И. Вавилова. – № 2015104525/15; заявл. 10.02.2015; опубл. 27.07.2016, Бюл. № 21.
47. Пат. 953759 СССР, A61K39/395. Способ получения иммунной сыворотки / В. П. Евдаков, Л. Ф. Мосалова, А. М. Нажмитдинов [и др.]. – № 3250637/28-13; заявл. 22.12.1980; опубл. 15.06.1983, Бюл. № 22.
48. Петров, Р.В.Иммуногены и вакцины нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – М.: "ГЭОТАР-Медиа", 2011. – 608 с.
49. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов: Справочник /

- В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец [и др.]. – СПб.: Проспект науки, 2006. – 336 с.
50. Получение гипериммунной адсорбированной сыворотки крови кроликов к ДМСО-антигену кишечной иерсиниозного микроба / С. В. Иващенко, С. В. Козлов, А. А. Щербаков [и др.]. // Научная жизнь. – 2015. – № 1. – С. 162-167.
51. 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.
52. 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.
53. Применение полиоксидония для получения специфических антител к бактериальным антигенам / А. М. Ляпина, Т. И. Полянина, О. В. Ульянова [и др.]. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – С. 39.
54. Псевдотуберкулёз / И. А. Шурыгина, М. В. Чеснокова, В. Т. Климов [и др.]. – Новосибирск: Наука, 2003. – 320 с.
55. 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.
56. Савина, С. В. Изучение влияния химической полиэлектролитной субстанции-адъюванта на эмбриотоксичность и тератогенность лабораторных животных / С. В. Савина, В. М. Скорляков // Аграрный научный журнал. – 2017. – № 12. – С. 48-50.
57. 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.
58. Свойства диметилсульфоксид-фракции *Yersinia enterocolitica* / А. Хаджу, С. В. Иващенко, Я. В. Древко [и др.]. // Научная жизнь. – 2014. – № 6. – С. 149-155.
59. Сомов, Г. П. Псевдотуберкулез / Г. П. Сомов, В. И. Покровский, Н. Н. Беседнова. – М.: Медицина, 1990. – 239 с.
60. 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. – № 3 (74). – С. 57-60.
61. Спирихина, Т. В. Сравнительное изучение штаммов *Yersinia enterocolitica* различного происхождения: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.07 / Т. В. Спирихина. – Саратов, 2006. – 23 с.
62. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* / А. Элдер, В. И. Вершинина, К. С. Хаертынов [и др.]. // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 1. – С. 18-22.
63. Сравнительная оценка двух тест-систем для идентификации энтеробактерий / Е. Б. Лазарева, Г. В. Залогуюева, Л. Н. Никифорова, Д. Д. Меньшиков // Клинич. лаб. диагност. – 1994. – № 1. – С. 50-51.
64. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев [и др.]. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
65. 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. – № 5 (47). – С. 55-56.
66. 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.

67. Хапцев, З. Ю. Усовершенствование лабораторной диагностики кишечного иерсиниоза сельскохозяйственных животных: автореф. дис. канд. биол. наук.: 03.00.07 / З. Ю. Хапцев – Саратов, 2000. – 21 с.
68. Ценёва, Г. Я. Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза: пособие для врачей / Г. Я. Ценёва. – С.-Пб., С.-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 1997. – 64 с.
69. Ценёва, Г. Я. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний / Г. Я. Ценёва, Н. Ю. Солодовникова, Е. А. Воскресенская / Клини. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2002. – № 3 (4). – С. 248-266.
70. Шарапова, Т. А. Изучение иммунологических сдвигов у больных псевдотуберкулезом (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой) / Т. А. Шарапова, А. М. Корлюк // Природ.-очаг. болезни Урала, Сиб. и Дальн. Востока: Матер. межобластной науч.-практич. конф. – Свердловск: Средне-Уральское книжн. изд-во, 1969. – С. 173-174.
71. Эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика и меры профилактики псевдотуберкулеза человека. Методические рекомендации, утверждённые Министерством здравоохранения РСФСР от 25.07.1988 г. – Москва, 1988. – 15 с.
72. 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.
73. A broadly cross-protetive monoclonal antibody binding to *Escherichia coli* and *Salmonella* lipopolysaccharides / F. E. Di Padova, H. Brade, R. Barclay [et al.]. // Infect. Immun. – 1993. – № 9 (61). – P. 3863-3872.
74. A method for obtaining an antigen with a molecular weight of 45 kda from *Mycobacterium tuberculosis* / A. Elder, V. I. Vershinina, K. S. Khaertynov [et al.]. // Fundamental research. – 2013. – № 1. – P. 18-22.

75. A multifunctional core-shell nanoparticle for dendritic cell-based cancer immunotherapy / N. H. Cho, T. C. Cheong, J. H. Min [et al.]. // Nat. Nanotechnol. – 2011. – № 10 (6). – P. 675-682.
76. A practical approach to the use of nanoparticles for vaccine delivery / J. Wendorf, M. Singh, J. Chesko [et al.]. // J. Pharm. Sci. – 2006. – № 12 (95). – P. 2738-2750.
77. A YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane / A. Holmstrom, J. Pettrson, R. Rosqvist [et al.]. // Mol. Microbiol. – 1997. – № 1 (24). – P. 73-91.
78. Adams, G. A. Extraction of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria rriitfh dimetwyl sulfbxide / G. A. Adams // Can. J. Biochem. – 1907. – Vol. 45. – P. 422-426.
79. Aerosolized PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine / C. Thomas, A. Rawat, L. Hope-Weeks, F. Ahsan // Mol. Pharm. – 2011. – № 2 (8). – P. 405-415.
80. Alving, C.R. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants / C. R. Alving // Immunobiol. – 1993. – Vol. 187. – P. 430-446.
81. Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* / K. Trülsch, A. Roggenkamp, M. Aepfelbacher [et al.]. // Int. J. Med. Microbiol. – 2003. – № 2-3 (293). – P. 167-177.
82. 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. – № 2 (156). – P. 388-391.
83. Arakawa, T. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide / T. Arakawa, Y. Kita, S. N. Timasheff // Biophys. Chem. – 2007. – № 1-3 (131). – P. 62-70.
84. Assembly of hepatitis E vaccine by ‘in situ’ growth of gold clusters as nano-adjuvants: an efficient way to enhance the immune responses of vaccination /

- H. Wang, Y. Ding, S. Su [et al.]. // *Nanoscale Horiz.* – 2016. – № 5 (1). – P. 394-398.
85. Assessment of the adjuvant activity of mesoporous silica nanoparticles in recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen vaccines / V. G. Virginio, N. C. Bandeira, F. M. A. Leal [et al.]. // *Heliyon.* – 2017. – № 1 (3). – e00225.
86. Assessment of the efficacy of an autogenous vaccine against *Yersinia pseudotuberculosis* in young Merino sheep / K. J. Stanger, H. McGregor, M. Marendia [et al.]. // *N. Z. Vet. J.* – 2019. – № 1 (67). – P. 27-35.
87. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles / Y.-S. Chen, Y.-C. Hung, I. Liao [et al.]. // *Nanoscale Res. Lett.* – 2009. – № 8 (4). – P. 858-864.
88. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function / E. T. Rietschel, T. Kirikae, U. Schade [et al.]. // *FASEB J.* – 1994. – № 2 (8). – P. 217-225.
89. Bhaduri, S. Isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* from swine feces recovered during the National Animal Health Monitoring System Swine 2000 study / S. Bhaduri, I. Wesley // *J. Food Prot.* – 2006. – № 9 (69). – P. 2107-2112.
90. Bernas, T. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC / T. Bernas., J. W. Dobrucki // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – № 1 (380). – P. 108-116.
91. Bioserotypes and virulence markers of *Y. enterocolitica* strains isolated from roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) / A. Banczerz-Kisiel, A. Szczerba-Turek, A. Platt-Samoraj [et al.]. // *Pol. J. Vet. Sci.* – 2014. – № 2 (17). – P. 315-319.
92. Bliska, J.B. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEP2 cells / J. B. Bliska, M. C. Copass, S. Falkow // *Infect. Immun.* – 1993. – № 9 (61). – P. 3914-3921.

93. Boland, A. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection / A. Boland, G. R. Cornelis // *Infect. Immun.* – 1998. – № 5 (66). – P. 1878-1884.
94. 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. – № 2 (26). – P. 383-392.
95. 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.
96. Calcium phosphate coupled Newcastle disease vaccine elicits humoral and cell mediated immune responses in chickens / S. Koppad, G. D. Raj, V. P. Gopinath [et al.]. // *Res. Vet. Sci.* – 2011. – № 3 (91). – P. 384-390.
97. Calcium phosphate nanoparticle prepared with foot and mouth disease virus P1-3CD gene construct protects mice and guinea pigs against the challenge virus / D. H. Joyappa, C. A. Kumar, N. Banumathi [et al.]. // *Vet. Microbiol.* – 2009. – № 1-2 (139). – P. 58-66.
98. Calcium phosphate nanoparticles as a new generation vaccine adjuvant / Y. Lin, X. Wang, X. Huang [et al.]. // *Expert. Rev. Vaccines.* – 2017. – № 9 (16). – P. 895-906.
99. Cambronne, E. D. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica* / E. D. Cambronne, J. A. Sorg, O. Schneewind // *J. Bacteriol.* – 2004. – № 3 (186). – P. 829-841.
100. *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella enterica* and their simultaneous occurrence in German fattening pig herds and their environment / C. Nathues, P. Gruning, A. Fruth [et al.]. // *J. Food Prot.* – 2013. – № 10 (76). – P. 1704-1711.
101. Caren, L. D. Dimethyl sulfoxide: lack of suppression of the humoral immune response in mice / L. D. Caren, H. M. Owen, A. D. Mandel // *Toxicol. Lett.* – 1985. – № 2-3 (26). – P. 193-197.

102. 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. – № 7 (76). – P. 832-839.
103. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A / E. T. Rietschel, L. Brade, K. Brandenburg [et al.]. // *Rev. Infect. Dis.* – 1987. – Vol. 9. – P. 527-236.
104. China, B. The pYV plasmid of *Yersinia* encodes a lipoprotein YlpA, related to TraT / B. China, B. Michiels, G. R. Cornelis // *Mol. Microbiol.* – 1990. – № 9 (4). – P. 1585-1593.
105. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Gilles, J. Hamilton [et al.]. // *Analyt. Chem.* – 1956. – № 3 (28). – P. 350-356.
106. Combined use of released proteins and lipopolysaccharide in enzyme-linked immunosorbent assay for serologic screening of *Yersinia* infections / O. Mäki-Ikola, J. Heesemann, R. Lahesmaa [et al.]. // *J. Infect. Dis.* – 1991. – № 2 (163). – P. 409-412.
107. Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000 / A. McNally, T. Cheasty, C. Fearnley [et al.]. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2004. – № 1 (39). – P. 103-108.
108. Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen / B. Slütter, P. C. Soema, Z. Ding [et al.]. // *J. Control. Release.* – 2010. – № 2 (143). – P. 207-214.
109. Construction of conjugates of colloidal selenium and colloidal gold with the protein of influenza virus and the study of their immunogenic properties / P. V. Mezhenny, S. A. Staroverov, A. A. Volkov [et al.]. // *Bull. Saratov State Agrarian Univ.* – 2013. – № 2. – P. 29-32.
110. Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms / R. Laukkanen, P. O. Martinez,

- K.-M. Siekkinen [et al.]. // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2009. – № 6 (6). – P. 681-688.
111. David, N. A. The pharmacology of dimethyl sulfoxide / N. A. David // *Annu. Rev. Pharmacol.* – 1972. – Vol. 12. – P. 353-374.
112. Detection, enumeration and characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in pig tonsils at slaughter in Northern Italy / S. Bonardi, I. Alpigliani, S. Pongolini [et al.]. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2014. – Vol. 177. – P. 9-15.
113. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy / S. Bonardi, F. Brindani, G. Pizzin [et al.]. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2003. – № 1-2 (85). – P. 101-110.
114. Determination of the epitope specificity of monoclonal antibodies against the inner core region of bacterial lipopolysaccharides by use of 3-deoxy-D-mannooctulosonate-containing synthetic antigens / A. Rozalski, L. Brade, H.-M. Kuhn [et al.]. // *Carbohydr. Res.* – 1989. – Vol. 193. – P. 257-270.
115. 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. – № 5. – P. 3-8.
116. Distribution of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in China / X. Wang, Z. Cui, D. Jin [et al.]. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – № 10 (28). – P. 1237-1244.
117. Donadini, R. *Yersinia pseudotuberculosis* superantigens / R. Donadini, B. A. Fields // *Chem. Immunol. Allergy.* – 2007. – Vol. 93. – P. 77-91.
118. Dykman, L. A. Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious diseases / L. A. Dykman // *Expert. Rev. Vaccines.* – 2020. – № 5 (19). – P. 465-477.
119. Effects of dimethyl sulfoxide on humoral immune responses to acetylcholine receptors in the rat / A. Pestronk, R. Teoh, C. Sims, D. B. Drachman // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1985. – № 2 (37). – P. 172-178.

120. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529 / J. T. Evans, C. W. Cluff, D. A. Johnson [et al.]. // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2003. – № 2 (2). – P. 219-229.
121. Enhancement of "Memory cell" pool by polyanions in mice / T. Diamantstein, B. Theden, R. Schmüderrich, J. Kielmann // *Experientia*. – 1973. – № 6 (29). – P. 707-708.
122. Evaluation of isolation methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig intestinal content / R. Laukkanen, M. Hakkinen, J. Lunden [et al.]. // *J. Appl. Microbiol.* – 2010. – № 3 (108) – P. 956-964.
123. Fast and sensitive detection of enteropathogenic *Yersinia* by immunoassays / J. Laporte, C. Savin, P. Lamourette [et al.]. // *J. Clin. Microbiol.* – 2015. – № 1 (53). – P. 146-159.
124. Forsberg, A. In vivo expression of virulence genes of *Yersinia pseudotuberculosis* / A. Forsberg, R. Rosqvist // *Infect. Agents. Dis.* – 1993. – Vol. 2. – P. 275-278.
125. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // *Nature Phys. Sci.* – 1973. – № 105 (241). – P. 20-22.
126. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula / E. Claassen, W. Leeuw, P. Greeve [et al.]. // *Res. Immunol.* – 1992. – № 5 (143). – P. 478-483.
127. Garçon, N. Development and evaluation of AS03, an adjuvant system containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion / N. Garçon, D. W. Vaughn, A. M. Didierlaurent // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2012. – № 3 (11). – P. 349-366.
128. Garçon, N. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems / N. Garçon, M. Mechelen // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2011. – № 4 (10). – P. 471-486.
129. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN / M.-

- N. Marenne, L. Journet, L. J. Mota, G. R. Cornelis // *Microb. Pathog.* – 2003. – № 6 (35). – P. 243-258.
130. Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov / M. Adeolu, S. Alnajar, S. Naushad, R.S. Gupta // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2016. – № 12 (66). – P. 5575-5599.
131. Gold nanoparticles as an adjuvant: influence of size, shape, and technique of combination with CpG on antibody production / L. A. Dykman, S. A. Staroverov, A. S. Fomin [et al.]. // *Int. Immunopharmacol.* – 2018. – Vol. 54. – P. 163-168.
132. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo / K. Niikura, T. Matsunaga, T. Suzuki [et al.]. // *ACS Nano.* – 2013. – № 5 (7). – P. 3926-3938.
133. Golden-star nanoparticles as adjuvant effectively promotes immune response to foot-and-mouth disease virus-like particles vaccine / Z. Teng, S. Sun, H. Chen [et al.]. // *Vaccine.* – 2018. – № 45 (36). – P. 6752-6760.
134. Granfors, K. Measurement of immunoglobulin M, immunoglobulin G, and immunoglobulin A antibodies against *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay: comparison of lipopolysaccharide and whole bacterium as antigen / K. Granfors, M. K. Viljanen, A. Toivanen // *J. Clin. Microbiol.* – 1981. – № 1 (14). – P. 6-14.
135. Gurtovenko, A. A. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide / A. A. Gurtovenko, J. Anwar // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – № 35 (111). – P. 10453-10460.
136. Heesemann, J. Enteropathogenic yersinias: pathogenicity factors and new diagnostic methods [Germany] / J. Heesemann // *Immun. Infect.* – 1990. – № 6 (18). – P. 186-191.

137. Hillaireau, H. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery / H. Hillaireau, P. Couvreur // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – № 17 (66). – P. 2873-2896.
138. Hornbeck, P. Enzyme-linked immunosorbent assays / P. Hornbeck, S. E. Winston, S. A. Fuller // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 11.11.2. – P. 1-22.
139. Humoral and cellular immunity induced by antigens adjuvanted with colloidal iron hydroxide / H. Leibl, R. Tomasits, P. Bruhl [et al.]. // *Vaccine.* – 1999. – № 9-10 (17). – P. 1017-1023.
140. Immune enhancing potential of sphere and rod gold nanoparticles to Rift Valley fever vaccine relative to time: in vitro study / M. G. Soliman, A. F. Mohamed, R. A. El Sayed [et al.]. // *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.* – 2017. – № 6 (4). – P. 529-536.
141. Immunization of mice by hollow mesoporous silica nanoparticles as carriers of porcine circovirus type 2 ORF2 protein / H-C. Guo, X-M. Feng, S-Q. Sun [et al.]. // *Virology Journal.* – 2012. – Vol. 9. – Article № 108.
142. Immunization of mice with peptomers covalently coupled to aluminum oxide nanoparticles A. Frey, N. Mantis, P. A. Kozlowski [et al.]. // *Vaccine.* – 1999. – № 23-24 (17). – P. 3007-3019.
143. Immunogenic properties of colloidal gold / L. A. Dykman, M. V. Sumaroka, S. A. Staroverov [et al.]. // *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* – 2004. – № 1 (31). – P. 75-79.
144. Immunogenic properties of lipid A / C. Galanos, M. A. Freudenberg, F. Jay [et al.]. // *Rev. Infect. Dis.* – 1984. – № 4 (6). – P. 546-552.
145. Immunogenicity of conjugates of protective antigen complexes of tularemia microbe with gold nanoparticles / L. A. Dykman, O. A. Volokh, E. M. Kuznetsova [et al.]. // *Nanotechnol. Russ.* – 2018. – № 7-8 (13). – P. 384-392.

146. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15 / L. V. Carvalho, R. D. Ruiz, K. Scaramuzzi [et al.]. // *Vaccine*. – 2010. – № 50 (28). – P. 7829-7836.
147. Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide / S.-H. Huang, C.-H. Wu, S.-J. Chen [et al.]. // *Immunobiology*. – 2020. – № 3 (225). – Article № 151906.
148. 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. – № 4 (151). – P. 436-439.
149. In vivo delivery of bovine viral diarrhoea virus, E2 protein using hollow mesoporous silica nanoparticles / D. Mahony, A. S. Cavallaro, K. T. Mody [et al.]. // *J. Name*. – 2013. – Vol. 00 – P. 1-3.
150. Influence of isolation methods on the occurrence of plasmid-carrying *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 in slaughter pig tonsils, faeces and carcass surface swabs / I. Van Damme, D. Berkvens, J. Bare, L. De Zutter // *Int. J. Food Microbiol.* – 2013. – № 1 (164). – P. 32-35.
151. Intranasal vaccination with ISCOMATRIX® adjuvanted influenza vaccine / A. Coulter, R. Harris, R. Davis [et al.]. // *Vaccine*. – 2003. – № 9-10 (21). – P. 946-949.
152. Iriarte, M. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells / M. Iriarte, G. R. Cornelis // *Mol. Microbiol.* – 1998. – № 3 (29). – P. 915-929.
153. Iron oxide nanoparticles as a clinically acceptable delivery platform for a recombinant blood stage human malaria vaccine / K. Pusic, Z. Aguilar, J. McLoughlin [et al.]. // *FASEB J.* – 2013. – Vol. 27. – P. 1153-1166.
154. Isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* from pigs and bovines in Chile / C. F. Borie, M. A. Jara, M. L. Sánchez [et al.]. // *Zentralbl. Veterinarmed. B.* – 1997. – № 6 (44). – P. 347-354.

155. Jacob, S. W. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage / S. W. Jacob, J. C. De la Torre // *Pharmacol. Rep.* – 2009. – № 2 (61). – P. 225-35.
156. Jacobs, D. M. Immunomodulatory effects of bacterial lipopolysaccharide / D. M. Jacobs // *J. Immunopharmacol.* – 1981. – № 2 (3). – P. 119-132.
157. 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. – № 4 (27). – P. 748-751.
158. Kareem, S. Improvement of Newcastle disease virus vaccine by using gold nanoparticles and some natural food additives / S. Kareem, M. B. Altimimi, B. A. Jarullah // *J. Thi-Qar. Sci.* – 2017. – № 2 (6). – P. 59-64.
159. Knudsen, K. A. Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens / K. A. Knudsen // *Anal. Biochem.* – 1985. – № 2 (147). – P. 285-288.
160. Kuhn, H. M. ECA, the enterobacterial common antigen / H. M. Kuhn, U. Meier-Dieter, H. Mayer // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1988. – № 3 (4). – P. 195-222.
161. 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. Ser.: Earth. Environ. Sci.* – 2020. – Vol. 421. – Article № 052022.
162. 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. – P. 179-183.
163. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – № 5259 (227). – P. 680-685.
164. LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukariotic cells / M. R. Sarker, M. P. Sory, A. P. Boyd [et al.]. // *Infect. Immun.* – 1998. – № 6 (66). – P. 2976-2979.

165. Li, X Tailoring inorganic nanoadjuvants towards next-generation vaccines / X. Li, X. Wang, A. Ito // *Chem. Soc. Rev.* – 2018. – № 13 (47). – P. 4954-4980.
166. Lipid A, the lipid component of bacterial LPS: relation of chemical structure to biological activity / E. T. Rietschel, H. W. Wollenweber, U. Zahringer, O. Luderitz // *Klin. Wschr.* – 1982. – № 14 (60). – P. 705-709.
167. Liposome-based delivery system for vaccine candidates: constructing an effective formulation / A. K. Giddam, M. Zaman, M. Skwarczynski, I. Toth // *Nanomedicine (Lond.)*. – 2012. – № 12 (7). – P. 1877-1893.
168. MF59 adjuvant: the best insurance against influenza strain diversity / D. T. O'Hagan, R. Rappuoli, E. De Gregorio [et al.]. // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2011. – № 4 (10). – P. 447-462.
169. Modulating antibacterial immunity via bacterial membrane-coated nanoparticles / W. Gao, R. H. Fang, S. Thamphiwatana [et al.]. // *Nano Lett.* – 2015. – № 2 (15). – P. 1403-1409.
170. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines / J. Aucouturier, L. Dupuis, S. Deville [et al.]. // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2002. – № 1 (1). – P. 111-118.
171. Morçöl, T. Calcium phosphate nanoparticle (CaPNP) for dose-sparing of inactivated whole virus pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in mice / T. Morçöl, B. L. Hurst, E. B. Tarbet // *Vaccine*. – Vol. 35. – P. 4569-4577.
172. Nanoparticle orientationally displayed antigen epitopes improve neutralizing antibody level in a model of porcine circovirus type 2 / P. Ding, T. Zhang, Y. Li [et al.]. // *Int. J. Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – P. 5239-5254.
173. Negatively charged glyconanoparticles modulate and stabilize the secondary structures of a gp120 V3 loop peptide: toward fully synthetic HIV vaccine candidates / P. Di Gianvincenzo, J. Calvo, S. Perez [et al.]. // *Bioconjug. Chem.* – 2015. – № 4 (26). – P. 755-765.

174. Nielsen, B. Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O:3 in experimentally infected pigs / B. Nielsen, C. Heisel, A. Wingstrand // Vet. Microbiol. – 1996. – № 3-4 (48). – P. 293-303.
175. Noad, R. Virus-like particles as immunogens / R. Noad, P. Roy // Trends Microbiol. – 2003. – № 9 (11). – P. 438-444.
176. Obtaining and characteristic of antibodies to *Vibrio cholerae* protective antigens conjugated with gold nanoparticles / L. A. Dykman, O. A. Volokh, O. V. Gromova [et al.]. // Dokl. Biochem. Biophys. – 2020. – № 1 (490). – P. 19-21.
177. Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in swine / A. Farzan, R. M. Friendship, A. Cook, F. Pollari // Zoonoses Public. Health. – 2010. – № 6 (57). – P. 388-396.
178. 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. – P. 872-887.
179. Pederson, K. J. The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulating ail gene expression in *Yersinia enterocolitica* / K. J. Pederson, S. Carlson, D. E. Pierson // Mol. Microbiol. – 1997. – № 1 (26). – P. 99-107.
180. Plasmidmediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: Relationship to the outer membrane protein Yop1 and possible importance for pathogenesis / G. Kapperud, E. Namork, M. Skurnik, T. Nesbakken // Infect. and Immunol. – 1987. – № 9 (55). – P. 2247-2254.
181. Platt-Samoraj, A. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from aborted fetuses and sows in pig farms with reproductive disturbances / A. Platt-Samoraj, W. Szweda, M. Ugorski // Pol. J. Vet. Sci. – 2009. – № 2 (12). – P. 189-193.
182. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly (-glutamic acid) with l-phenylalanine as a protein carrier / T. Akagi,

- T. Kaneko, T. Kida, M. Akashi // *J. Control. Release.* – 2005. – № 2-3 (108). – P. 226-236.
183. Preparation and efficacy of a live Newcastle disease virus vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles / K. Zhao, G. Chen, ShiX-m [et al.]. // *PLoS ONE.* – 2012. – № 12 (7). – Article № e53314.
184. Preparation and in vivo evaluation of glyco-gold nanoparticles carrying synthetic mycobacterial hexaarabinofuranoside / G. L. Burygin, P. I. Abronina, N. M. Podvalnyy [et al.]. // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 480-493.
185. 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. – № 11 (68). – P. 6202-6208.
186. 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. – № 2 (94). – P. 209-213.
187. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy / S. Bonardi, L. Bassi, F. Brindani [et al.]. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2013. – № 2-3 (163). – P. 248-257.
188. 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. – № 6 (6). – P. 719-724.
189. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland / M. Fredriksson-Ahomaa, S. Wacheck, M. Koenig [et al.]. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2009. – № 3 (135). – P. 199-202.
190. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France / M. Fondrevez, B. Minvielle, A. Labbe [et al.]. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2014. – Vol. 174. – P. 56-62.

191. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pigs in Zuru local government area, Kebbi state / M. S. Jibrin, O. O. Falekeb, M. D. Salihub [et al.]. // Sci. J. Vet. Adv. – 2013. – № 12 (2). – P. 189-196.
192. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs / J. Liang, X. Wang, Y. Xiao [et al.]. // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – № 8 (78). – P. 2949-2956.
193. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in raw cow's milk collected from stables of Mexico City / L. Bernardino-Varo, E. I. Quinones-Ramirez, F. J. Fernandez., C. Vazquez-Salinas // J. Food Prot. – 2013. – № 4 (76). – P. 694-698.
194. Prospects for the use of spherical gold nanoparticles in immunization / S. A. Staroverov, A. A. Volkov, P. V. Mezhenyy [et al.]. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – № 1 (103). – P. 437-447.
195. 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. – № 2 (59). – P. 93-102.
196. 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. – № 4 (58). – P. 303-319.
197. Reduction of enteropathogenic *Yersinia* in the pig slaughterhouse by using bagging of the rectum / R. Laukkanen, J. Ranta, X. Dong [et al.]. // J. Food Prot. – 2010. – № 12 (73). – P. 2161-2168.
198. 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. – № 8 (11). – P. 596-601.

199. Respiratory syncytial virus f subunit vaccine with AS02 adjuvant elicits balanced, robust humoral and cellular immunity in BALB/c mice / Y. Zheng, L. Bian, H. Zhao [et al.]. // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – Article № 526965.
200. Rosqvist, R. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption / R. Rosqvist, A. Forsberg, H. WolfWatz // *Infect. Innun.* – 1991. – № 12 (59). – P. 4562-4569.
201. Rubin, L. F. Toxicologic update of dimethyl sulfoxide / L. F. Rubin // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1983. – Vol. 411. – P. 6-10.
202. Sahly, H. E. MF59™ as a vaccine adjuvant: a review of safety and immunogenicity / H. E. Sahly // *Expert. Rev. Vaccines.* – 2010. – № 10 (9). – P. 1135-1141.
203. Saikia, G. K. Enterotoxigenicity as an attribute of virulence in *Yersinia enterocolitica* / G. K. Saikia, D. C. Thapliyal // *Indian. J. Experiment. Biol.* – 1997. – № 10 (35). – P. 1108-1110.
204. Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica* / V. B. Young, V. L. Miller, S. Falkow, G. K. Schoolnik // *Mol. Microbiol.* – 1990. – № 7 (4). – P. 1119-1128.
205. 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. – P. 219-227.
206. Signalling pathways involved in the activation of dendritic cells by layered double hydroxide nanoparticles / A. Li, L. L. Qin, D. Zhu [et al.]. // *Biomaterials*. – 2010. – № 4 (31). – P. 748-756.
207. Simple synthesis route of mesoporous AlOOH nanofibers to enhance immune responses / X. Wang, X. Li, Y. Sogo, A. Ito // *RSC Adv.* – 2013. – Vol. 22. – P. 8085-8566.

208. Simultaneous occurrence of *Salmonella enterica*, *Campylobacter spp.* and *Yersinia enterocolitica* along the pork production chain from farm to meat processing in five conventional fattening pig herds in Lower Saxony / J.-K. Niemann, T. Alter, G. Götz [et al.]. // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. – 2016. – № 7-8 (129). – P. 296-303.
209. Single-walled carbon nanotubes deliver peptide antigen into dendritic cells and enhance IgG responses to tumor-associated antigens / C. H. Villa, T. Dao, I. Ahearn [et al.]. // ACS Nano. – 2011. – № 7 (5). – P. 5300-5311.
210. Size-dependent neutralizing activity of gold nanoparticle-based subunit vaccine against dengue virus / Q. H. Quach, S. K. Ang, J.-H. J. Chu [et al.]. // Acta. Biomater. – 2018. – Vol. 78. – P. 224-235.
211. Skvor, I. Characterization of rabbit antibodies for immunochemical detection of *Yersinia enterocolitica* / I. Hochel, J. Skvor // Folia. Microbiol. (Praha). – 2007. – № 5 (52). – P. 511-518.
212. Smith, E.R. The single- and repeated-dose toxicity of dimethyl sulfoxide / E. R. Smith, Z. Hadidian, M. M. Mason // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1967. – № 1 (141). – P. 96-109.
213. Sonnevend, A. *Yersinia* Yop-specific IgA antibodies in Hungarian blood donors / A. Sonnevend, E. Czirók, T. Pál // Folia. Microbiol. (Praha). – 2005. – № 3 (50). – P. 269-272.
214. Sundberg, L. TyeA of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in regulation of Yop expression and is required for polarized translocation of Yop effectors / L. Sundberg, A. Forsberg // Cell. Microbiol. – 2003. – № 3 (5). – P. 187-202.
215. Staroverov, S. A. Use of gold nanoparticles for the preparation of antibodies to tuberculin, the immunoassay of mycobacteria, and animal vaccination / S. A. Staroverov, L. A. Dykman // Nanotechnol. Russia. – 2013. – № 11-12 (8). – P. 816-822.
216. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by

- the YopB, D, N delivery apparatus / A. Boland, M. P. Sory, M. Iriarte [et al.]. // EMBO J. – 1996. – № 19 (15). – P. 5191-5201.
217. Stills, H. F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants / H. F. Stills // ILAR J. – 2005. – № 3 (46). – P. 280-293.
218. Structure and function of lipopolysaccharides / C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, I. R. Poxton // Microbes and Infection. – 2002. – Vol. 4. – P. 837-851.
219. Studying the immunogenic properties of plague microbe capsule antigen F1 conjugated with nanoparticles of colloid gold and silver / M. N. Kireev, T. A. Polunina, N. P. Guseva [et al.]. // Prob. Particularly Dangerous Infect. – 2008. – № 96 (2). – P. 43-45.
220. Synergistic effect of two nanotechnologies enhances the protective capacity of the *Theileria parva* sporozoite p67c antigen in cattle / A. Lacasta, K. T. Mody, I. De Goeyse [et al.]. // J. Immunol. – 2021. – Vol. 206. – P. 686-699.
221. Synthesis of a novel kind of carbon nanoparticle with large mesopores and macropores and its application as an oral vaccine adjuvant / T. Wang, M. Zou, H. Jiang [et al.]. // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2011. – № 5 (44). – P. 653-659.
222. Synthetic virus-like particles prepared via protein corona formation enable effective vaccination in an avian model of coronavirus infection / H.-W. Chen, C.-Y. Huang, S.-Y. Lin [et al.]. // Biomaterials. – 2016. – Vol. 106. – P. 111-118.
223. Systemic antibody response to nano-size calcium phosphate biocompatible adjuvant adsorbed HEV-71 killed vaccine / M. I. Saeed, A. R. Omar, M. Z. Hussein [et al.]. // Clin. Exp. Vaccine Res. – 2015. – № 1 (4). – P. 88-98.
224. T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein / A. Uenaka, H. Wada, M. Isobe [et al.]. // Cancer. Immun.: A Journal of the Academy of Cancer Immunology. – 2007. – Vol. 7. – P. 9-19.
225. The bacteriological and serological prevalence of *Campylobacter spp.* and *Yersinia enterocolitica* in fattening pig herds in Lower Saxony /

- A. Von Altrock, A. L. Louis, U. Rosler [et al.]. // Berl Munch Tierarztl Wochenschr – 2006. – № 9-10 (119). – P. 391-399.
226. The effect of polyazolidinammonium on the dynamics of the synthesis of pseudotuberculosis antibodies / S. V. Ivashchenko, V. S. Kuznetsova, S. V. Savina, V. M. Skorlyakov // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2020. – Vol. 421. – Article № 022055.
227. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica* / M. Iriarte, J. C. Vanooteghem, I. Delor [et al.]. // Mol. Microbiol. – 1993. – № 3 (9). – P. 507-520.
228. The superantigen gene ypm is located in an unstable chromosomal locus of *Yersinia pseudotuberculosis* / C. Carnoy, S. Floquet, M. Marceau [et al.]. // J. Bacteriol. – 2002. – № 16 (184). – P. 4489-4499.
229. The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation / V. Sokolova, T. Knuschke, A. Kovtun [et al.]. // Biomaterials. – 2010. – № 21 (31). – P. 5627-5633.
230. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii* / C. Savin, L. Martin, C. Bouchier [et al.]. // Int. J. Med. Microbiol. – 2014. – № 3-4 (304). – P. 452-463.
231. TLR4 agonists as immunomodulatory agents / M. R. Alderson, P. McGowan, J. R. Baldrige, P. Probst // J. Endotoxin. Res. – 2006. – № 5 (12). – P. 313-319.
232. 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. – № 9 (76). – P. 4350-4354.
233. 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. – № 17 (74). – P. 5444-5450.
234. Tsubokura, M. A simplified antigenic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: phenotypic characterization of reference strains and prepa

- ration of O and H factor sera / M. Tsubokura, S. Aleksić // Contrib. Microbiol. Immunol. – 1995. – Vol. 13. – P. 99-105.
235. 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. – № 1-2 (48). – P. 93-101.
236. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: new developments and perspectives / N. Z. Zhang, J. Chen, M. Wang [et al.]. // Exp. Rev. Vaccines. – 2013. – № 11 (12). – P. 1287-1299.
237. Validation of a method for the detection of virulent *Yersinia enterocolitica* and their distribution in slaughter pigs from conventional and alternative housing systems / B. Nowak, T. V. Mueffling, K. Caspari, J. Hartung // Vet. Microbiol. – 2006. – № 2-4 (117). – P. 219-228.
238. Van Damme, I. *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture / I. Van Damme, I. Habib, L. De Zutter // Food Microbiol. – 2010. – № 1 (27). – P. 158-161.
239. 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. – № 8 (69). – P. 4670-4675.
240. 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. – № 1-2 (139). – P. 64-69.
241. Wu, S.-H. Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers / S.-H. Wu, Y. Hung, C.-Y. Mou // Chem. Commun. – 2011. – Vol. 47. – P. 9972-9985.
242. Yavuz, E Gold-based nano-adjuvants. Proc. IEEE 7-th / E. Yavuz, E. U. Bagriacik // International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties. – Odessa, Ukraine, 2017. – Article № 04NB06-1–04NB06-4.

243. *Yersinia* Base: a genomic resource and analysis platform for comparative analysis of *Yersinia* / S. Y. Tan, A. Dutta, N. S. Jakubovics [et al.]. // BMC Bioinformatics. – 2015. – № 1 (16). – Article № 9.
244. *Yersinia enterocolitica* in sheep – a high frequency of biotype 1a / K. Soderqvist, S. Boqvist, G. Wauters [et al.]. // Acta. Vet. Scand. – 2012. – № 1 (54). – P. 39-45.
245. *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer / A. Schmid, S. Dittmann, V. Grimminger [et al.]. // Protein. Expr. Purif. – 2006. – № 2 (49). – P. 176-182.
246. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica* / M. R. H. Hurst, S. A. Becher, S. D. Young [et al.]. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2011. – № 4 (61). – P. 844-849.
247. *Yersinia nurmii* sp. nov / A. Murros-Konttinen, M. Fredriksson-Ahomaa, H. Korkeala [et al.]. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2011. – № 10 (61). – P. 2368-2372.
248. *Yersinia similis* sp. nov / L. D. Sprague, H. C. Scholz, S. Amann [et al.]. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – № 4 (58). – P. 952-958.
249. Yersiniosis as a gastrointestinal disease / R. Leino, K. Granfors, T. Havia [et al.]. // Scand. J. Infect. Dis. – 1987. – № 1 (19). – P. 63-68.
250. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis / K. Andersson, N. Carballeira, K. E. Magnusson [et al.]. // Mol. Microbiol. – 1996. – № 5 (20). – P. 1057-1069.
251. Zinc oxide nanoparticles provide an adjuvant effect to ovalbumin via a Th2 response in Balb/c mice / R. Roy, S. Kumar, A. K. Verma [et al.]. // Int. Immunol. – 2014. – № 3 (26). – P. 159-172.

ПРИЛОЖЕНИЕ

УТВЕРЖДАЮ:
 И.о. проректора по НИР
 ФГБОУ ВО "Саратовский ГАУ"
 И.Л. Воротников
 " 27 " июня 2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению иммуноферментной тест-системы
 для ускоренного выявления возбудителей кишечного иерсиниоза и
 псевдотуберкулёза животных в средах накопления
 (организация-производитель – ФГБОУ ВО "Саратовский ГАУ")

1. Продукт:

иммуноферментная тест-система для ускоренного выявления возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза (энтеропатогенных иерсиний) животных в средах накопления на третьи и более сутки их "холодового обогащения".

2. В состав набора входят:

- планшеты для ИФА (иммуноферментного анализа) – 1 шт.;
- антиген кишечной иерсиниозной для контроля, 10 мкг;
- антиген псевдотуберкулёзный для контроля, 10 мкг;
- таблетки ФСБ рН=7,2-7,6, 1 г – 10 шт.;
- твин-20 – 0,5 мл;
- бычий сывороточный альбумин (БСА) – 0,4 г;
- сыворотка диагностическая к энтеропатогенным иерсиниям животных, полученная от морской свинки – 0,1 мл;
- сыворотка диагностическая к энтеропатогенным иерсиниям животных, полученная от кролика – 0,2 мл;
- сыворотка крови морской свинки для отрицательного контроля – 0,1 мл;
- 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) – 10 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, перекись водорода – прозрачные и бесцветные жидкости;

- антивидовой коньюгат, стоп-раствор, перекись водорода – прозрачные и бесцветные жидкости;
- твин-20 – густая, прозрачная, слегка желтоватая жидкость;
- таблетки ФСБ рН=7,2-7,6 – твёрдые, белого цвета;
- антигены для контроля, лимонная кислота, натрия фосфат однозамещённый – порошки белого цвета;
- ОФД – пластины бежевого цвета;
- БСА – пластины белого цвета.

4. Биологические свойства.

Сыворотки диагностические к энтеропатогенным иерсиниям животных получены иммунизацией морской свинки и кролика диметилсульфоксид-антигеном псевдотуберкулёзного микроба и способны выявлять клетки *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* в средах накопления: 1%-й забуференной пептонной воде (1% ЗПВ) и фосфатно-солевом буферном растворе с рН=7,6-7,8 (ФСБ рН=7,6-7,8), на третьи и более сутки их "холодового обогащения". Образовавшийся комплекс антиген-антитело определяется посредством коньюгата и субстрата по изменению окраски содержимого лунки.

5. Способ применения.

Приготовление растворов.

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

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

Раствор № 3. БСА растворить в 20 мл раствора № 1. Раствор хранению не подлежит.

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

Раствор № 5. Антиген псевдотуберкулёзный для контроля растворить в 1 мл раствора № 1.

Раствор № 6. Сыворотку диагностическую к энтеропатогенным иерсиниям животных, полученную от морской свинки, растворить в 5 мл раствора № 1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор № 7. Сыворотку диагностическую к энтеропатогенным иерсиниям животных, полученную от кролика растворить в 10 мл раствора № 1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор № 8. Сыворотку крови морской свинки для отрицательного контроля растворить в 5 мл раствора № 1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор № 9. Антивидовой коньюгат растворить в 11 мл раствора № 1. Раствор хранению не подлежит.

Раствор № 10. Растворить лимонную кислоту и натрия фосфат однозамещённый в 12,5 мл дистиллированной воды. Раствор хранить не более 1 месяца при температуре 4°C.

Раствор № 11. ОФД растворить в 12,5 мл раствора № 10. Раствор готовят не ранее, чем за 10 минут до использования.

Раствор № 12. Таблетку гидроперита растворить в 10 мл дистиллированной воды. Раствор хранению не подлежит.

Раствор № 13. Внести 0,15 мл раствора № 12 в 12,5 мл раствора № 11. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Проведение ИФА

Планшеты используются однократно. Исследуемый материал предварительно обрабатывается 1%-м формалином 4 часа.

1. В нечётные ряды лунок планшета вносят по 100 мкл раствора № 6, а в чётные ряды – по 100 мкл раствора № 8 (отрицательный контроль).

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

3. Несорбированный материал удаляют из лунок сильным вытряхиванием и трёх кратным 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 и 2-ю лунки первого ряда планшета добавляют по 100 мкл растворов № 4 и № 5 соответственно (положительные контроли). В остальные лунки планшета вносят пробы исследуемых сред накопления с фекалиями. Исследование каждой пробы проводят внесением её в 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 № 7.

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 № 9.

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 № 13.

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

18. В лунки, использованные в п. 1, вносят при помощи восьми канального дозатора по 100 мкл стоп-раствора.

Учёт результатов проводят на планшетном фотометре при длине волны 490 нм. Сначала учитывают реакции с двумя контрольными антигенами. Они должны 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:

- контрольные антигены хранить не более 1 месяца при температуре 4°C;
- стоп-раствор хранить не более 1 месяца при температуре 20°C
- сыворотки диагностические и отрицательную, а также антивидовой конъюгат хранить не более 1 года при температуре -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 20°C в сухом, тёмном месте.