

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»**

Факультет ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий

Кафедра микробиологии, биотехнологии и химии

ДОПУЩЕНО к защите:

Зав. кафедрой _____ И.О. Фамилия

«__» _____ 20__ г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация на тему:

**Использование полиазолидинаммония в качестве адьюванта
при получении гипериммунных сывороток крови к
дезинтегрированным мембранам иерсиний**

Направление подготовки

19.04.01 Биотехнология

Направленность (профиль)

Биотехнология

Обучающийся:

Атапина Анастасия Алексеевна

(подпись)

Руководитель выпускной квалификационной работы:

Доцент, канд.хим. наук Исайчева Людмила Анатольевна

(подпись)

Рецензент:

Кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории холерных вакцин

ФКУЗ Российского научно-исследовательского института «Микроб»
Роспотребнадзора

(подпись)

Киреев Михаил Николаевич

Саратов 2021

Содержание

Введение	3
Раздел 1 Обзор и анализ научно-технической литературы	6
1.1 Распространенность энтеропатогенных иерсиний	6
1.2 Антигены энтеропатогенных иерсиний	10
1.2.1 Липополисахаридные антигены	10
1.2.2 Белковые антигены	13
1.3 Лабораторная диагностика иерсиниозов	15
1.3.1 Бактериологическая диагностика	16
1.3.2 Серологическая диагностика	20
1.3.3 Генетическая диагностика	25
1.4 Адьюванты	26
1.5 Гипериммунные сыворотки	32
Раздел 2 Биологические объекты, материалы и методы исследования	35
2.1 Биологические объекты	35
2.2 Материалы	35
2.3 Методы исследования	37
2.3.1 Культивирование бактерий	37
2.3.2 Получение мембранных оболочек микроба	
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	38
2.3.3 Получение ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i>	39
2.3.4 Получение гипериммунных сывороток	39
2.3.5 Постановка иммуноферментного анализа	40
2.4 Схема эксперимента	41
Раздел 3 Результаты исследования и их анализ	43
Заключение	48
Выводы	50
Список источников литературы	51

Введение

В настоящее время бактериальные инфекции представляют собой глобальную проблему. Ярким примером бактерии, которая вызывает опасные инфекции является *Yersinia*.

Yersinia – бактерия из семейства *Enterobacteriaceae* порядка *Enterobacterales*, грамотрицательные палочки, факультативные анаэробы. Включает в себя 18 видов, самые распространенные из них: *Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. pseudotuberculosis*), *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) и *Yersinia pestis* (возбудитель чумы) [25]. К энтеропатогенным иерсиниям относят возбудителей псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза.

Псевдотуберкулёз – инфекционная патология человека и сельскохозяйственных животных, сопровождающаяся у людей развитием тяжелого интоксикационного синдрома, специфической экзантемой и выраженной лихорадкой, а у молодняка животных кишечными расстройствами [20].

Основной резервуар возбудителя и источник заболеваний человека – грызуны. Они высоко восприимчивы к *Yersinia*, всегда имеют возможность инфицировать своими выделениями продукты питания, воду и почву [21].

Вспышки псевдотуберкулеза наносят серьезный вред здоровью человека и сельскохозяйственных животных, поэтому диагностика псевдотуберкулеза является актуальной.

Кишечный иерсиниоз – острая инфекционная болезнь, характеризующаяся преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта у молодняка сельскохозяйственных животных, полиморфизмом клинических проявлений у взрослых животных (маститы, аборт, истощение) и рецидивирующим, затяжным течением, также страдают люди. Возбудителем болезни является *Y. enterocolitica*.

Основным резервуаром возбудителя являются грызуны. Животноводческие помещения (корм для животных), овощехранилища считаются иде-

альными условиями обитания для переносчиков заболевания. Вспышки иерсиниоза наносят значительный убыток для сельскохозяйственной деятельности, а также наносят вред здоровью населения, поэтому диагностика кишечного иерсиниоза необходима [27,73].

Y. pseudotuberculosis и *Y. enterocolitica* не имеют значительных биологических и антигенных различий, что определяет сходство приёмов их индикации и идентификации. Дезинтегрированные мембраны и *Yersinia pseudotuberculosis* могут служить в качестве антигенов для создания надежных, специфических и высокочувствительных препаратов по диагностике псевдотуберкулеза сельскохозяйственных животных

В настоящее время для выявления псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза используются экспресс-методы диагностики, которые включают в себя такие реакции, как иммуноферментный анализ (ИФА), реакция непрямой агглютинации (РНГА), ориентировочная реакция агглютинации (ОРА), метод флуоресцирующих антител (МФА). Для нашего исследования был выбран метод ИФА, так как данный метод является специфичным и точным анализом в отличие от бактериологической диагностики [1, 20].

Исследования на псевдотуберкулез необходимо проводить в комплексе с исследованиями на кишечный иерсиниоз, так как не редко у свиней, КРС в кишечнике выявляют одновременную циркуляцию *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, поэтому требуется создание как видоспецифичных, так и родоспецифичных антительных тест-систем.

Применение диагностических антител является одним из наиболее распространенных методов индикации энтеропатогенных иерсиний. Получение от лабораторных животных-доноров гипериммунных сывороток крови с высокими содержанием псевдотуберкулезных антител требует использования адъювантов. Один из веществ, перспективных для использования в качестве адъюванта является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами галогенов (ПААГ).

Таким образом, исследования, направленные на изучения антигенных свойств дезинтегрированных мембран (ДМ) *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, а также изучение возможности использования ПААГ для получения гипериммунных сывороток крови являются актуальными.

Целью наших исследований явилось использование полиазолидинаммония в качестве адьюванта при получении гипериммунных сывороток крови к дезинтегрированным мембранам энтеропатогенных иерсиний.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить влияние ДМ *Y. pseudotuberculosis* на гуморальную и клеточную подсистемы иммунитета белых мышей.
2. Получить гипериммунные сыворотки крови кроликов к ДМ *Y. pseudotuberculosis* с использованием ПААГ и полного адьюванта Фрейнда (ПАФ).
3. Провести сравнительную оценку антительной активности гипериммунных сывороток, полученных с применением ПААГ и ПАФ.
4. Оценить специфичность полученных сывороток крови.

Раздел 1 Обзор и анализ научно-технической литературы

1.1 Распространенность энтеропатогенных иерсиний

Иерсиниозы относятся к распространенным в мире инфекциям. Заболеваемость псевдотуберкулезом и кишечным иерсиниозом регистрируется в нашей стране практически каждый день, но наблюдается неравномерное распространение инфекций по отдельным территориям Российской Федерации, а также в странах Западной и Северной Европы, Великобритании, США, Канаде и Японии.

В основном, заражению подвергаются свиньи, крупный и мелкий рогатый скот, а также птицы.

Кишечный иерсиниоз протекает у свиней с охватом большого поголовья и клинически проявляется диареей, геморрагическим диатезом, артритом, дерматитом, конъюнктивитом. Возможен летальный исход. У взрослых свиней чаще наблюдается кишечное и глоточное носительство без явного переболевания. Возбудитель выделяется из организма в основном с фекалиями и мочой [9, 12].

При заражении новорождённых животных выделение патогенных иерсиний с фекалиями у молодняка начинается в 12-14 недель и достигает максимума к 19-20 неделям. У более старых животных возбудитель иерсиниоза локализуется в миндалинах, а из фекалий выделяются в основном непатогенные био/серо варианты.

Однако основная масса свиней заражается кишечными иерсиниями во время откорма (2-8 месяцев).

Кроме свиного поголовья циркуляция *Y. enterocolitica* выявлялась у других одомашненных животных и птиц: КРС (крупный рогатый скот), овец, коз, кроликов, собак, кошек, птиц [10, 24,70].

Клинические проявления и заболеваемость при кишечном иерсиниозе различные, это зависит от вида животного, например, для КРС характерна спорадическая заболеваемость. Телята болеют с поражением ЖКТ (желудочно-кишечный тракт), реже суставов и лёгких. Взрослый КРС переносит инфекцию латентно, при обострении наблюдают диарею и аборты. Возбудитель выделяется из организма с молоком, фекалиями, мочой и носовыми истечениями. Для кроликов характерны массовая заболеваемость и высокая летальность с симптомами поражения ЖКТ. У птицы инфекционный процесс протекает латентно. У мелкого рогатого скота и плотоядных кишечный иерсиниоз изучен слабо.

Информации о циркуляции псевдотуберкулёзного микроба у животных меньше, чем по кишечной иерсиниозной. Источником инфекции являются больные или переболевшие животные, которые выделяют возбудителя *Y. pseudotuberculosis* во внешнюю среду с мочой и испражнениями.

Факторами передачи инфекции являются: почва, вода, корма, воздух и другие контаминированные выделениями инфицированных животных объекты внешней среды.

Псевдотуберкулёз у животных возникает спорадически или в виде небольших вспышек.

Проникает возбудитель псевдотуберкулеза в организм восприимчивых животных (птицы) через пищеварительный тракт, через дыхательные пути, при аэрогенном заражении (вдыхание зараженной пыли). У овец заражение может происходить через ранения кожи (стрижка, укус) [23, 34, 39, 44, 45, 68, 71, 76].

Инкубационный период точно не ясен, он варьирует в пределах – от 3 до 14 дней, в среднем 5-10 дней.

Симптомы псевдотуберкулеза не всегда проявляются при жизни животных, поэтому длительность инкубационного периода не точна.

У каждого вида животных и птиц возникают разные симптомы, например, у птиц наблюдается взъерошенность перьевого покрова, ухудшение аппетита, незадолго до смерти появляется понос.

У овец, коз поражаются лимфатические узлы, легочная ткань, развивается анемия и истощение.

У свиней наблюдают отеки в области головы и живота, диарею. У лошадей поражаются лимфатические сосуды, образуются язвы и абсцессы, у кобыл аборт и последующие гинекологические патологии. В основном характерна циркуляция у свиней O:3 сероварианта псевдотуберкулёзного микроба (100% от выделенных культур), для Англии – O:3 (34%), O:1 (26%), O:2 (24%). В Южной Америке циркулируют O:1 и O:3 сероварианты, в Северной Америке – O:3, в Африке – O:1, в Японии – O:3, O:1, O:4 [28, 29, 37, 77].

У коров наблюдается образование творожисто-гнойных очагов, при сдавливании выделяется гной, у телят, жеребят и поросят болезнь сопровождается поражением желудочно-кишечного тракта.

Болезнь протекает в четырех формах:

1. лимфаденитная форма характеризуется поражением поверхностных лимфатических узлов, устанавливаемым пальпацией. При данной форме заболевания поражаются, как правило, поверхностные шейные лимфатические узлы, которые чаще травмируются при стрижке;

2. висцеральная в лимфатических узлах и паренхиматозных органах образуются гнойно-некротические инкапсулированные очаги, специфические клинические признаки отсутствуют;

3. генитальная характеризуется поражением половых органов;

4. генерализованная характеризуется появлением гнойно-некротических очагов в лимфатических узлах, внутренних органах и других тканях.

Клинически инфекция может сопровождаться рядом признаков для данной болезни:

1. нескоординированными движениями (в случае сильного увеличения шейных или паховых лимфатических узлов);

2. «вертячкой» (при локализации очагов в головном мозге);

3. хронической тимпанней;

4. орхитами (воспаление семенника);

5. маститами у овцематок и др.

При поражении легких лишь в последней стадии инфекционного процесса появляются симптомы бронхопневмонии, наступает истощение.

Гибель может наступить в течение 20 дней после начала болезни. Болеют и гибнут животные в любом возрасте, но чаще молодняк. При вскрытии трупов находят гнойное воспаление стенок тощей и слепой кишок, множественные микроабсцессы в кишечной стенке и других органах брюшной и грудной полостей.

При длительном воздействии возбудителя и его токсинов у животных происходит снижение иммунитета, что так же приводит к губительным последствиям.

Иммунитет окончательно не изучен. За рубежом (в частности, в Австралии) для иммунизации животных применяют анатоксин и анатоксин-бактериальные вакцины, которые создают определенный иммунитет – уменьшается образование абсцессов, но полной защиты от заболевания не формируется [22, 26, 57, 58, 61, 65, 66].

Псевдотуберкулез у людей встречается часто и непосредственно связан с грызунами, они являются переносчиками данного заболевания. Они высоко восприимчивы к *Yersinia*, всегда имеют возможность инфицировать своими выделениями продукты питания, воду и почву. В основном, заражение происходит алиментарно, через продукты питания, поэтому необходимо тщательно промывать продукты перед употреблением.

Таким образом, можно сделать вывод, что инфекции *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* являются широко распространёнными и опасными заболеваниями, для животных и людей.

Как выяснилось, заболевания могут проходить скрыто, либо без характерных симптомов, что усложняет постановку диагноза и требует проведения лабораторной диагностики.

1.2 Антигены энтеропатогенных иерсиний

По многочисленным исследованиям, антигенная структура возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза достаточно хорошо изучена, но, по мере накопления экспериментальных данных антигенная композиция бактерий продолжает уточняться.

Грамотрицательные бактерии окружены наружной мембраной, которая отделена периплазматическим пространством от цитоплазматической мембраны.

Периплазма имеет окислительную среду, которая обеспечивает фолдинг белков. В ней находится слой пептидогликана, который представляет собой полимер, который состоит из чередующихся молекул N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты [4].

Псевдотуберкулезный микроб имеет сложную антигенную структуру, состав. Антигенная структура представлена иммунодоминантными антигенами липополисахаридной и белковой природы.

1.2.1 Липополисахаридные антигены

Липополисахарид (ЛПС) является уникальной структурой, присущей только грамотрицательным бактериям. ЛПС является одним из основных факторов патогенности грамотрицательных бактерий. ЛПС состоит из трех частей:

1. Гидрофобного липида А, который погружен в наружный слой внешнего мембранного бислоя, а также липид А ответствен за большинство физиологических эффектов, которые вызывает ЛПС в организме животных и человека, таких как пирогенность, токсичность, реакция Шварцмана.

2. Корового олигосахарида – играет существенную роль в устойчивости бактерии к действию нормальной сыворотки крови.

3. О-боковых цепей, называемых также О-антигеном.

Для многих серотипов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, химическая структура О-антигенов известна, О-специфические цепи определяют О-антигенную специфичность бактерии.

ЛПС *Y. pseudotuberculosis* является типичным для энтеробактерий эндотоксином и играет важную роль в патогенезе инфекции.

Штаммы *Y. pseudotuberculosis* подразделяются на семь серогрупп. Несколько исследований были выполнены на О-специфические полисахариды ЛПС из групп I-VII. Было показано, что их химический состав очень разнообразен. Все полисахариды *Y. pseudotuberculosis* разветвлены гексозаминогликанами, характеризующиеся наличием гексоз, 6-дезоксигексозы, N-ацетил-2-амино-2-дезоксигексозы и 3,6-дидезоксигексозы их структуры, описанные Книрелем и Кочетковым.

Эти авторы отметили, что основное различие между полисахаридами из семи серогрупп является концевая группа, обозначенная как 3,6-дидезоксигексозы (в серотипы IB, IC, III, IVA, VA, VII) [5,31,51].

О-боковые цепи ЛПС псевдотуберкулёзного микроба являются гетерополимерами, состоящими из повторяющихся олигосахаридных звеньев. На основании различий в структуре О-антигена в настоящее время выделяют 21 серотип псевдотуберкулёзного микроба, некоторые из них разделяются на подгруппы.

Возбудитель псевдотуберкулеза синтезирует S-хемотип ЛПС, который является основным биополимером клеточной стенки.

ЛПС в S форме состоит из О-полисахаридных цепей, олигосахаридного кора и липида А.

У различных сероваров *Y. pseudotuberculosis* ЛПС имеет индивидуальный состав моносахаридов, но отдельные сахара обнаружены у всех сероваров. При этом различные сочетания сахаров играют особую роль в серологической специфичности возбудителя псевдотуберкулеза [56].

Согласно данным С.И. Бахолдиной, температура культивирования оказывает существенное влияние на длину О-полисахаридной цепи ЛПС *Y. pseudotuberculosis* [32].

О-антигены псевдотуберкулезного микроба неоднородны, но по своему строению состоят из нескольких компонентов, которые определяют антигенные связи как между серовариантами внутри вида, так и с другими представителями.

Антигенные связи *Y. enterocolitica* с *Y. pseudotuberculosis* выражены слабо за исключением сероварианта О:1 псевдотуберкулезного микроба с серовариантами О:8; О:18; О:21 кишечной иерсиниозного микроба [28, 72].

О-антиген находится в клеточной стенке *Y. enterocolitica* и по химической природе является ЛПС. Антиген устойчив к нагреванию и воздействию спирта. Структура О-антигена позволяет различать около 30 серовариантов *Y. enterocolitica*. Данный антиген имеет диагностическое значение. При длительном культивировании на питательных средах иерсинии могут утрачивать О-антиген.

Структура О-антигена меняется при переходе микроба из S-формы в R-форму. Это связано с отсутствием О-специфических боковых цепей в ЛПС у R-варианта. От людей и животных наиболее часто выделяется *Y. enterocolitica* серовариантов О:3; О:9; О:5,27; О:4,32; О:8 [46, 48, 53, 55, 70,75].

Y. enterocolitica также была разделена на различные серотипы в зависимости от их О-соматических антигенов [29].

О-специфические полисахариды *Y. enterocolitica* являются либо полисахариды или разветвленные гетерополисахариды.

О-антигены серогрупп: О: 1,2а, 3 и О: 2,3 содержат 6-дезоксигалактурозу в качестве единственного сахарного компонента [30, 31].

О-антиген серогруппы О: 9 [31], также является гомополимером 1,2-связанного 4,6-дидезокси-4-формамидо-D-маннопиранозильные остатки.

Таким образом, несмотря на токсичность, липополисахарид высоко специфичен за счёт О-цепи сахаров и может быть использован в качестве антигена при получении диагностических сывороток. Его токсические свойства, обусловленные липидом А, требуют тщательного подбора иммунизирующей дозы. При этом ориентироваться только на литературные данные не допустимо, т.к. токсичность зависит не только от вида бактерии, но и от конкретного штамма микроба.

1.2.2 Белковые антигены

Патогенные свойства *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* обусловлены наличием в бактериальной клетке плазмиды вирулентности рYV.

Родоспецифичная плазида вирулентности иерсиний кодирует белок адгезин (YadA) и белки наружной мембраны (Yops), которые характеризуется антигенной активностью, однако их диагностическая ценность различна.

Размер плазмиды вирулентности составляет 42-47 кДа.

Наружняя мембрана иерсиний представлена как родоспецифическими, так и видоспецифическими белками, которые являются общими для патогенных иерсиний.

Псевдотуберкулезный микроб синтезирует термостабильный токсин белковой природы, молекулярная масса которого 45 кДа. Этот белок является видоспецифичным, устойчив к высокой температуре, а также воздействию анионного детергента.

Н-антиген термолабилен. Диагностического значения не имеет, разрушается перед постановкой РА (реакция агглютинации) кипячением бактериальной культуры [4, 14, 15].

Н-антиген входит в состав жгутиков *Y. enterocolitica*, имеет белковую природу, разрушается при кипячении и синтезируется бактериями при температуре ниже 30 °С. Известно 20 Н-серовариантов кишечной иерсиниозного микроба, выявляемых при диагностике инфекции [18, 28, 32].

Также известны следующие белки наружной мембраны возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза, которые определяют их вирулентность и детерминированные в рYV:

1. YadA (*Yersinia adhesin A*; Yop 1, YopA) – адгезин, относится к типу V_c . Максимальный биосинтез достигается при температуре 37 °С и больше.

При благоприятных условиях культивирования поверхность микробной клетки может быть покрыта полностью [47].

Молекулярная масса белка *Y. pseudotuberculosis* равна 103 кДа, а *Y. enterocolitica* 100 кДа. Главная функция белка – защита клетки.

2. YpA – липопротеин иерсиний, экспрессируется при температуре 37 °С и в отсутствии Ca^{2+} .

3. Белок L_{cr} (или V-антиген) – молекулярная масса 37 кДа, кодируется плазмидой вирулентности и обеспечивает контакт с рецепторами клеток-мишеней, обладает иммуносупрессирующими свойствами.

Некоторые факторы патогенности кодируются хромосомными генами. К ним относятся белки Inv, Ail и Myf:

1. Белок Inv – инвазин, способствует прикреплению к поверхности и проникновению внутрь эпителия слизистой оболочки кишечника уже на ранней стадии инфекции. Ген инвазина (*inv*) присутствует в вирулентных и неvirulentных штаммах иерсиний, однако у последних он находится в неактивном состоянии.

2. Белок Ail обладает свойствами сходными с инвазином, но его активность более специфична. Его ген *ail* имеется только у вирулентных иерсиний. Молекулярная масса 17 кДа, локализован на поверхности мембраны и кодируется хромосомным геном *ail* (attachment invasion locus).

3. Белок Myf входит в состав фимбрий *Y. enterocolitica* и отвечает за адгезию. Аналогичные белки обнаружены также у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* под названием рН6-антиген – молекулярная масса 21 кДа, кодируемый хромосомным геном MyfA (mucoid *Yersia* factor).

При этом рН6-антиген имеет 44% гомологии с Myf-белком *Y. enterocolitica* (Iriate et al., 1993; Revell et al., 2001). Белок экспрессируется

при температуре 37 °С и низких значениях рН в стационарной фазе роста. Синтез белка Муf происходит только у вирулентных иерсиний [49, 52, 55, 67, 70].

Таким образом, можно сделать вывод, что антигены клеточной стенки иерсиний имеют большое разнообразие и высокую активность, что делает их пригодными для получения гипериммунных сывороток.

1.3 Лабораторная диагностика иерсиниозов

Диагностика псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза носит комплексный характер и предусматривает оценку клинической картины заболевания совместно с данными эпидемиологического анамнеза и результатами лабораторных исследований.

Лабораторные исследования материалов от больных (подозрительных на заболевание) осуществляют лаборатории, организации, структурные подразделения, которые имеют санитарно-эпидемиологическое заключение и лицензию на выполнение работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности. Для подтверждения диагноза и установления этиологии применяют бактериологический, серологический и генетические методы [2].

Диагноз у животных ставят на основании результатов бактериологического (выделяют бактериальную культуру с определением вирулентности), генетического (используют ПЦР), иммунологического (серотипируют выделенную культуру бактерий, выявляют антигены в патологическом материале, определяют нарастание титра антител в парных сыворотках, выявляют антитела классов А, М и G) исследований с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков болезни и патологоанатомической картины

1.3.1 Бактериологическая диагностика

Бактериологическое исследование это выделение бактерий и изучение их свойств с целью постановки микробиологического диагноза. Существуют следующие принципы бактериологического исследования:

1. Квалифицированный выбор материала, подлежащего исследованию: для клинических образцов – с учетом характера и локализации патологического процесса, патогенеза заболевания и его стадии; для объектов окружающей среды – с учетом возможного значения их в качестве путей и факторов передачи микроорганизмов – возбудителей инфекций.

2. Отбор проб материала для исследования в необходимом и достаточном объеме. Обеспечение своевременной доставки материала для сохранения жизнеспособности искомым бактериям.

3. Выбор оптимального набора соответствующих питательных сред для первичного посева и накопления возбудителя с учетом характера материала, свойств искомого микроорганизма и посевных доз.

4. Соблюдение классических принципов тщательного изучения посевов.

5. Изучение фенотипических характеристик выделенных чистых культур, в первую очередь биохимических свойств с максимально возможной стандартизацией условий их определения. 6. Определение согласно классификационным таблицам таксономического положения выделенной культуры в соответствии с задачами исследования (родовой, видовой, внутривидовой принадлежности) [12].

Бактериологический метод исследования псевдотуберкулеза заключается в посеве кала, крови или других биологических материалов на питательную среду.

Исследуемый материал следует брать в асептических условиях в стерильную посуду и доставлять в лабораторию, как можно скорее. В случае необходимости пробы следует хранить на холоде. Методика взятия проб за-

висит от объекта, характера заболевания и свойств микроорганизма. Одним из распространенных приемов бактериологического исследования является бактериоскопия.

Существуют несколько официальных схем бактериологической диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза (у животных, людей и в пищевых продуктах).

За рубежом для бактериологической диагностики иерсиниозов используют международный стандарт ISO 10273:2003 (Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*), на основе которого был создан российский ГОСТ ISO 10273-2013.

Бактериологический метод у животных заключается в высеве биологического материала на плотные питательные среды. Высев на плотные питательные среды (ППС) проводят со среды ПК (пептонно-калиевые среды).

Высевы производят петлей из верхней трети слоя среды (но не с поверхности). Перед посевом содержимое пробирок не взбалтывают. При использовании среды Эндо и/или исследовании загрязненных проб, особенно при массовом поступлении, для ингибирования роста посторонней флоры, проводят щелочную обработку.

Методика щелочной обработки основана на относительной резистентности иерсиний к щелочи по сравнению с другими микроорганизмами:

В лунки полистироловых планшетов для иммунологических реакций вносят по 0,2 мл свежеприготовленного 0,72% раствора КОН в 0,5% растворе NaCl и 0,2 мл исследуемого материала, перемешивают, выдерживают 1-1,5 минуты и высевают на СБТС (дифференциально-диагностическая среда с бромтимоловым синим) или среду Эндо. Посевы инкубируют при (26 ± 2) °С.

Просмотр выросших колоний проводят, как правило, через 48 часов, после этого необходимо изучить и проанализировать их морфологию. Дан-

ная схема описана в методических указаниях эпидемиологического надзора и профилактики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза.

Отечественными авторами проводились исследования по усовершенствованию питательных сред в плане обеспечения скорости роста и возможности дифференциации иерсиний, в первую очередь *Y. pseudotuberculosis* от других бактерий, так как именно этот возбудитель с конца 50-х годов на Дальнем Востоке вызывал массовые эпидемические осложнения [6, 17, 20].

Бактериологический метод у людей состоит из 12 этапов:

1. Пробоподготовка и посев нативного материала.
2. Проводят высев со сред накопления на чашки Петри (на 2-3-е сутки) на СБТС/Эндо. Инкубируют 26 ± 2 °C 48 часов, на Эндо 24 часа.

Для инактивации посторонней микрофлоры перед каждым высевом на плотную питательную среду проводят щелочную обработку материала 0,72%-м раствором гидроксида калия в 0,5%-м растворе хлорида натрия (30-60 с).

3. Просмотр посевов; учет морфологии колоний (учитывают морфологические признаки микроскопией мазков, окрашенных по методу Грама).

4. Проводят идентификацию и дифференциацию уреазоположительных культур, которые были засеяны на 2 этапе в чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА).

5. Проводят высев со сред накопления (на 5-7-е сутки) на плотные дифференциально-диагностические среды после предварительной щелочной обработки. Проводят учет результатов биохимической идентификации и дифференциации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, проведенных на 4 этапе исследования. Проводят реакцию агглютинации на стекле с сывороткой к вирулентным иерсиниям. Выдача окончательного положительного ответа.

6. Просмотр посевов на дифференциально-диагностических средах, засеянных на 5 этапе исследования.

Проводят отбор характерных для *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* колоний на дифференциальную среду с мочевиной.

7. Проводят идентификацию и дифференциацию уреазоположительных культур, засеянных на 6 этапе исследования (8-10 сутки с начала исследования).

8. Проводят учет результатов биохимической идентификации и дифференциации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, проведенных на 7 этапе исследования. Проводят реакцию агглютинации на стекле с сывороткой к вирулентным иерсиниям.

9. Проводят высев со сред накопления на дифференциально-диагностические среды после предварительной щелочной обработки.

10. Просмотр посевов на дифференциально-диагностических средах, засеянных на 9-м этапе исследования.

11. Проводят идентификацию и дифференциацию уреазоположительного изолята, засеянного на 10-м этапе исследования.

12. Проводят учет результатов биохимической идентификации и дифференциации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, проведенных на 11-м этапе исследования (на 14-е сутки с начала исследования) [37, 38].

Передача выделенной культуры для дальнейшей идентификации в специализированную лабораторию возможна на любом этапе исследования.

Выдача окончательного положительного ответа.

Бактериологическая диагностика проводится и в пищевых продуктах и состоит из следующих этапов:

1. Обогащение в селективной жидкой среде.
2. Выделение типичных колоний.
3. Выделение типичных колоний, подтверждение принадлежности выделенных типичных колоний к бактериям семейства *Enterobacteriaceae*.
4. Определение количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (метод НВЧ – наиболее вероятное число).
5. Учет результатов.

В связи с психрофильностью и неприхотливостью иерсиний широкое применение при обследовании на иерсиниоз получил неофициальный метод выделения иерсиний, основанный на подрачивании их при низких положительных температурах (+4...+8 °С) в фосфатно-буферном растворе (Дунаев, Ющенко, Елкина, 1986).

Этими же авторами была предложена для подрачивания вместо фосфатного буфера стерильная дистиллированная вода (рН 6,8), в которой погибало до 80% микрофлоры кишечника, а гибель иерсиний не превышала 10-20%. Некоторыми авторами подчеркивается диагностическая эффективность жидкой среды накопления – БКД (Ценева, 1992; 1997; Хапцев, 2000; Ющук и соавт., 2003).

Таким образом, можно сделать вывод, что бактериологический метод диагностики трудоёмок, занимает много времени, недостаточно эффективен, имеет высокие требования к забору материала.

1.3.2 Серологическая диагностика

Серологическая диагностика включает в себя исследование сыворотки крови, а также других биологических субстратов для выявления антител и антигенов. Различают серологические реакции и иммунологические методы с применением физических и химических меток.

Серологические реакции – это реакции между антигенами (АГ) и антителами (АТ) *in vitro*, которые применяют для выявления антигенов или антител по одному известному реагенту и на основании полученных данных судят об имевшем место контакте между инфекционным агентом и макроорганизмом. Классическая диагностика основана на определении антител к предполагаемому возбудителю.

Серологическая диагностика – это методы изучения определенных антител или антигенов в сыворотке крови больных, основанные на реакциях иммунитета. Основные методы серологической диагностики возбудителя:

1. Метод флюоресцирующих антител (МФА) – является экспрессным методом диагностики, предложенным в 1967 году В.А. Знаменским. Он основан на визуальном учете в УФ-лучах люминесцентного микроскопа специфического взаимодействия флюоресцирующих антител и гомологичного антигена.

Результаты реакции оцениваются с помощью люминесцентного микроскопа. Оценивается характер свечения, форма и размер объекта.

Преимущества: быстрое получение результатов, довольно высокая чувствительность и универсальность применения для обнаружения различных антигенов (бактериальных, вирусных и др.), простота постановки.

Недостатки: необходимость наличия дорогостоящего люминесцентного микроскопа, малая информативность и производительность.

2. Реакция агглютинации (РА) – представляет собой простую реакцию склеивания антигенов при помощи антител. Используют для обнаружения антител в сыворотке крови больного. Результат проводят по четырехкрестной системе. В России серотипирование иерсиний проводят при помощи кишечной иерсиниозных и псевдотуберкулёзных (О:1 и О:3) диагностических О-моновалентных кроличьих сухих агглютинирующих сывороток производства ФГУН НИИЭМ им. Пастера.

3. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) – данная реакция основана на возможности эритроцитов адсорбировать антиген на своей поверхности и вызывать склеивание при его контакте с антителом с образованием осадка. Результат проводят по четырехкрестной системе. Для данной реакции применяют эритроцитарный диагностикум. Диагностикум получен на основе антигенов преимущественно липополисахаридной природы, фиксированных на поверхности формализированных бараньих эритроцитов.

4. Ориентировочная реакция агглютинации (ОРА) – применяется для определения сероварианта выделенных культур иерсиний и оценки их патогенности. Патогенность определяют СВИ (сыворотка к вирулентным иерсиниям) производства ФГУН НИИЭМ им. Пастера по наличию у бактерий ан-

тигенов вирулентности V и W, которые кодируются рУV. Зарубежными компаниями Чехии, Японии, Франции и других государств также выпускаются моновалентные кишечной иерсиниозные сыворотки.

Преимущества и недостатки РА и РНГА, ОРА: простота постановки и доступность; оценка результата проходит визуально, что приводит к неточностям, так же они менее специфичны и чувствительны.

5. Реакция коаггутинации (РКА) – используют для определения растворимых иерсиниозных антигенов в копрофильтратах на ранних стадиях заболевания (в течение первых пяти дней острой формы заболевания).

РКА характеризуется простотой приготовления диагностикума, низким расходом гипериммунной сыворотки, невысокой себестоимостью, быстротой постановки, недостаток – учет результата визуально, что нельзя считать корректным результатом.

В России Санкт-Петербургском НИИ вакцин и сывороток разработаны коммерческие препараты для диагностики иерсиниозов при помощи РКА и РЛА: псевдотуберкулезный иммуноглобулиновый латексный диагностикум, а также псевдотуберкулезный и кишечной иерсиниозные О:3; О:6,30; О:9 коаггутинирующие диагностикумы. Кроме коммерческих диагностикумов, различными исследователями создавались экспериментальных серий препаратов для РКА и РЛА при иерсиниозах [8, 18, 26].

6. Иммуноферментный анализ (ИФА) – является очень чувствительной, специфической и универсальной реакцией. В основе ИФА лежит принцип присоединения ферментной метки к антителам. Это позволяет увидеть результат реакции по появлению ферментной активности или по изменению ее уровня.

Метод ИФА включает 3 основных этапа:

1. формирование иммунного комплекса "антиген (исследуемое вещество) - специфическое к нему антитело" или наоборот;

2. образование связи конъюгата с образовавшимся на предыдущем этапе иммунным комплексом или со свободными местами связывания (детерминантами);

3. преобразование субстрата под воздействием ферментной метки в регистрируемый сигнал в результате биохимической реакции.

ИФА является наиболее широко используемым в мире иммунологическим методом диагностики псевдотуберкулёза.

В.Н. Багрянцев показал, что титры антител, выявляемых методом ИФА, в 10 раз превышают титры, определяемые с помощью РНГА.

Иммуноферментный анализ включает следующие этапы:

1. Посадка антигена на твердый носитель – полистироловый планшет, в качестве диагностического используют антиген, полученный на основе ЛПС.

2. Нанесение исследуемой сыворотки с заданным разведением.

3. Добавление в лунки полистиролового планшета – BSA (бычий сывороточный альбумин).

4. Нанесение конъюгата (меченые антитела)

5. Обработка результатов:

Результаты учитывают спектрофотометрически:

При спектрофотометрическом учете результатов содержимое лунок с отрицательным контрольным образцом (К-) используют в качестве нулевого контроля. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 450 нм и считают результат положительным, если коэффициент поглощения светового потока исследуемого образца достигает величины не менее 0,05 [30, 34, 41, 43, 44].

Выпускается коммерческая иммуноферментная тест-система к *Y. pseudotuberculosis* O:1 серовара в ФГУН НИИЭМ им. Пастера, созданная на основе ЛПС и обладающая чувствительностью 10^5 м.к./мл и эффективностью 70,2-81,1% [45].

Мамлеевой Д.А. было установлено, что ИФА в 6 раз более эффективна, чем бактериологический метод, и эффективность ИФА можно повысить двукратно после холодого обогащения исследуемого материала на обеднённой питательной среде в течение 5 суток [32].

Различают несколько десятков модификаций ИФА:

1. ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay) – метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами.

2. EIA (enzyme immunoassay) – метод на основе фермент-иммуноопределения.

3. EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) – способ, основанный на связи с ферментами.

ELISA и EIA – это методы гетерогенного или твердофазного анализа (ДИФА), EMIT является гомогенным ИФА [47, 54,63,74].

Метод гетерогенного ИФА состоит из 3 основных этапов:

1. иммобилизация антигена или антитела на твердой фазе, полученный комплекс называется иммуносорбентом;

2. удаление несвязавшегося реагента и блокирование сайтов связывания на твердой подложке с помощью блокирующих белков, таких, например, как альбумин, казеин: инкубация анализируемого препарата с иммуносорбентом для того, чтобы произошло их связывание;

3. детекция благодаря ферментативной активности самого исследуемого вещества или благодаря связанной с анализируемым препаратом ферментативной метке (прямой вариант).

Наиболее часто используются модификации данного метода на полистироловых планшетах и на мембранных фильтрах – дот-иммуноферментный анализ (ДИФА). Для выявления антигенов могут быть использованы различные варианты постановки ТИФА на планшетах: неконкурентные (прямой, непрямой, "сэндвич"), конкурентный, ингибиторный [55].

Дот-иммуноферментный анализ (ДИФА) – основан на иммунохимической реакции антиген-антитело. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата после добавления нерастворимого субстрата, образующего окрашенные (розовые) пятна различной интенсивности в местах связывания антигена и антитела.

ДИФА ничем не уступает ИФА, но является слишком дорогим методом.

В качестве экспериментальных образцов созданы ДИА тест-системы с ЗНЧ (дот-иммуноанализ без ферментной метки (ДИА)).

Иммуноферментный анализ имеет ряд преимуществ, по сравнению с другими реакциями:

используемые реагенты – универсальны, стабильны на протяжении полугода;

процесс учета результатов анализа автоматизирован;

обладает высокой воспроизводимостью результатов;

позволяет экономно расходовать реагенты [60, 62].

Таким образом, можно сделать вывод, что иммуноферментный анализ является наиболее эффективным, чувствительным и нетрудоемким методом диагностики.

1.3.3 Генетическая диагностика

Генетическая диагностика это, прежде всего, ПЦР-метод (полимеразная цепная реакция) – метод молекулярно-генетической диагностики, который позволяет выявить у человека и животных различные инфекционные и наследственные заболевания, как в острой и хронической стадии, так и задолго до того, как заболевание может себя проявить.

Из генетических методов диагностики кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза применяется ПЦР с детекцией продуктов синтеза в гелеэлектрофорезе, а также ПЦР в реальном времени с использованием

специфичных зондов TaqMan на основе разрушаемых олигонуклеотидов, содержащих флуоресцентный краситель и гаситель флуоресценции, или неспецифичного зонда в виде интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green.

Известно много способов обработки проб и экстракции ДНК для исследования в ПЦР, но в основном используют методику подготовки проб испражнений для исследования на псевдотуберкулез в ПЦР.

Преимуществом ПЦР в реальном времени является быстрая постановка реакции и возможность количественного подсчёта ДНК (дезоксинуклеиновая кислота) в пробе [16, 23, 25, 26, 36, 50].

Даже такая современная диагностика не может быть точной и имеет свои недостатки:

- 1) в результате выполнения данного способа получается препарат ДНК всех микроорганизмов, содержащихся в пробе, что значительно снижает чувствительность и специфичность при исследовании в ПЦР;

- 2) трудоемкость и многоэтапность способа, требующего приготовления многокомпонентных растворов;

- 3) длительность способа (3-4 часа);

- 4) высокая стоимость применяемых реактивов, особенно таких как лизоцим и протеиназа К [53, 55, 62].

Таким образом, можно сделать вывод, что ПЦР является чувствительным и специфичным методом диагностики. Однако данный диагностический метод высоко затратный, что затрудняет его применение в ветеринарных, районных лабораториях.

1.4 Адьюванты

Адьюванты (лат. Adjuvans – помогающий, способствующий) – являются вспомогательными факторами различного происхождения и различной

химической природы, которые оказывают неспецифическое стимулирующее действие на иммунный ответ.

Адьюванты включаются в состав вакцины с целью более быстрого формирования выраженного и длительно сохраняющегося специфического иммунного ответа.

Адьювантным действием обладают многие природные вещества: белки, пептиды, липополисахариды, нуклеиновые кислоты и другие.

На данный момент не существует единой классификации адьювантов, но они могут быть разделены в зависимости от их происхождения, механизма действия и физико-химических свойств.

Первая классификация адьювантов представлена тремя группами:

1. Вещества, выступающие в роли активных иммуностимуляторов, которые повышают иммунный ответ организма на введенный антиген;
2. Иммуногенные белки, которые служат носителями и при этом вызывают Т-клеточный ответ;
3. Адьюванты транспортного средства (масла, липосомы), которые являются матрицей для антигенов, они также стимулируют иммунный ответ [62].

Вторая классификация делит вспомогательные вещества на минеральные добавки, соли алюминия и подобные, бактериальные производные, поверхностно-активные вещества, транспортные средства и препараты, способствующие более медленному освобождению материалов или цитокинов.

Следующие авторы предложили систему классификации, которая разделяет адьюванты на группы: адьюванты на основе геля, поверхностно-активные вещества, бактериальные продукты, масляные эмульсии, белки или липопептиды [63].

В качестве адьювантов используются убитые микроорганизмы (микобактерии, коринебактерии, нокардии и другие), органические вещества (бактериальные полисахариды и липополисахариды, лецитин, холестерин, лано-

лин, агар, глицерин, желатин, крахмал, пектины, протамины и др.), неорганические вещества (гидроксид алюминия, фосфат алюминия, хлорид кальция, фосфат кальция, гидроксид железа, аммониево-кальциевые квасцы, минеральные масла и др.), синтетические вещества (нуклеотиды, полианионы).

Кроме простых адъювантов, используют сложные, представляющие собой смеси липидов с минеральными сорбентами, масел с липополисахаридами и эмульгаторами, микроорганизмов с маслами и другими веществами [6, 18, 30, 51].

Универсальных адъювантов не существуют, каждый из них имеет свои особенности и преимущества.

Механизм действия адъювантов, следующий:

1. образование депо в месте инъекции – это способствует увеличению времени контакта с АГ;
2. действие адъюванта в качестве системы доставки АГ, что стимулирует процессы поглощения АГ АПК;
3. активация системы врожденного иммунитета за счет передачи сигналов через мембранные и внутриклеточные паттерн-распознающие рецепторы, что приводит к активации транскрипционных факторов и адаптерных белков, опосредуя выработку провоспалительных цитокинов, хемокинов и интерферонов типа I;
4. индукция секреции цитокинов и хемокинов, которые участвуют в активации и миграции иммунокомпетентных клеток;
5. активация инфламмосомы – способствует формированию воспалительной реакции и индукции выработки провоспалительных цитокинов;
6. стимуляция активации и созревания АПК;
7. индукция развития клеточного и (или) гуморального иммунного ответа;
8. участие в реакции герминативных центров, стимуляция продукции высокоаффинных специфических IgG, стимуляция формирования В-клеток памяти при развитии гуморального иммунного ответа;

9. стимуляция формирования центральных Т-клеток памяти и Т-эффекторных клеток памяти [15,85,92].

В настоящее время для гипериммунизации наиболее широко распространены масляные адьюванты:

1. полный адьювант Фрейнда (ПАФ);
2. неполный адьювант Фрейнда (НАФ);

1. ПАФ – это водно-жировая эмульсия, которая состоит из следующих компонентов: вазелиновое масло, ланолин и эмульгатор. Его механизм действия, следующий: он депонирует антиген и усиливает его захват фагоцитами.

По стимуляции образования антител полный адьювант Фрейнда не имеет себе равных. Неоднократно в литературных данных отмечались побочные эффекты масляных адьювантов. Применение его в терапевтических целях ограничено, так как он вызывает образование абсцесса на месте введения, острую боль, лихорадку, возможность повреждения органов, про гибель животного в источниках указано не было.

Полный адьювант Фрейнда особенно эффективен как стимулятор клеточного иммунитета. Также, он значительно усиливает и продлевает гуморальный ответ, что впервые описано этим ученым. После внутримышечного введения эмульсии формируется «депо» иммуногена с медленным поступлением его в сосудистое русло.

2. НАФ – включает в себя такие же компоненты как и ПАФ, но в дополнении с БЦЖ (вакцина против туберкулеза). Это позволяет ему дополнительно активировать макрофаги и простимулировать Т-клетки.

Неполный адьювант Фрейнда используют для депонирования вещества, обладающего иммуногенными свойствами. Интенсивная выработка антител осуществляется благодаря постепенной резорбции иммуногена в месте инъекции. Несмотря на преимущества данного адьюванта, образование антител не продолжительно [24,82,87].

Адьювант Фрейнда не всегда может использоваться для стимуляции иммунитета, из-за многочисленных побочных эффектов.

Это вызвало интерес к поиску новых безвредных адьювантов. Среди них особое внимание заслужили некоторые полиэлектролиты, такие как полиоксидоний, которые уже сейчас призваны высокоэффективными. Также особый интерес представляет испытание полиазолидинаммония в качестве адьюванта.

Полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами галогенов (ПААГ), представляет собой биосовместимый полимер с молекулярной массой линейной цепи порядка 100-200 кДа, который характеризуется положительным зарядом (рисунок 1).

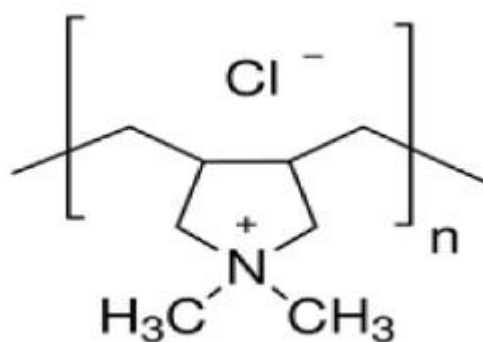


Рисунок 1 – Формула полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов

Полимер неограниченно растворим в воде.

При токсикологических исследованиях на биотестобъектах и белых лабораторных мышах позволили отнести полиазолидинаммоний к IV классу токсичности.

ПААГ получают при смешивании целлюлозогликолевой кислоты с дигидрокверцетином (либо с кверцетином) в среде сорбат-ацетатного буфера.

Оценка антимикробных свойств полимера показала широкий спектр его активности в отношении как стандартных, так и клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, микроскопических грибов и некоторых вирусов [33,88,89].

Однако, для повышения эффективности антимикробного действия необходимо учитывать особенности биологии возбудителя, в том числе связанные со строением микробных клеток.

Поскольку ПААГ является малоопасным соединением, он широко используется в качестве дезинфектанта для профилактической и текущей дезинфекции [40,42,92].

Использование полиазолидинаммония в иммунизациях животных для получения гипериммунных сывороток показало, что изобретение обеспечивает создание адьюванта, обладающего биологической совместимостью и гемосовместимостью, оптимальными физико-механическими свойствами, а также способностью быстро биорезорбироваться *in vivo* без образования токсичных продуктов и негативных реакций в процессе использования.

В литературе нет данных по использованию ПААГ при гипериммунизации, за исключением его применения в комплексе с хлоридом кальция, который сам является достаточно эффективным адьювантом.

Вакараева М.М. установила, прямую зависимость антимикробной активности ПААГ от концентрации в его составе гидрат-ионов йода в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

Йод обладает выраженными противомикробными свойствами. Для препаратов элементарного йода характерно выраженное местнораздражающее действие на ткани, а в высоких концентрациях – прижигающий эффект. Местное действие обусловлено способностью элементарного йода осаждать тканевые белки [34,43,55,69,71,78,91].

Важным аспектом в использовании ПААГ в иммунизациях животных является их безопасность.

Скорляков В.М., установил, что независимо от способа введения адьюванта в сочетании с CaCl_2 антиген-носителя, гематологические показатели соответствовали физиологической норме для данного вида животного, кроме того, на месте введения не развивается воспалительный или аллергический процесс.

В ходе его опытов были получены результаты, которые свидетельствуют о безопасности применения для организма животных, что позволяет его использовать в качестве адъюванта – антиген-носителя для вакцин с различными антигенными субстанциями [42].

Таким образом, можно сделать вывод, что ПААГ является достаточно безопасным и эффективным полиэлектролитным адъювантом и не использовался для гипериммунизации животных.

1.5 Гипериммунные сыворотки

Гипериммунные сыворотки – это сыворотки крови животных, систематически иммунизированных бактериальными или вирусными антигенами, содержащими антитела, которые оказывают сильное специфическое воздействие на бактериальные токсины, патогенные бактерии или вирусы, против которых были иммунизированы животные [8,82,87].

Гипериммунная сыворотка – сыворотка, содержащая антитела в наиболее высоком титре, по сравнению с иммунной сывороткой, это достигается благодаря повторной иммунизации.

Гипериммунная сыворотка используется для обеспечения пассивного иммунитета в предельно короткие сроки, например при острой инфекции, если человек или животное предварительно не получали вакцину. Такие сыворотки применяются в области ветеринарной вирусологии, микробиологии и биотехнологии, в частности при производстве биопрепаратов, которые предназначены для специфической иммунотерапии, пассивной профилактики смешанных форм инфекционных.

Большинство иммунологических методов исследования предусматривают применение иммунных сывороток, получаемых из крови животных, иммунизированных различными антигенами, при этом их активность существенно влияет на результаты исследования. Для получения сывороток необходимо подобрать рациональную схему иммунизации животных [49, 50].

Гипериммунизация – это метод парентерального введения животным нарастающих доз соответствующих антигенов с целью получения наивысшей ответной иммунологической реакции организма, а следовательно, и максимального увеличения в крови животных специфических антител, которое должно обеспечивать лечебный, профилактический и диагностический эффект препаратов.

Получение гипериммунных сывороток проходит в несколько этапов:

1. Подбор животных-продуцентов.
2. Грундиммунизация (грунди́рование) – отбор животных из числа завезенных, путем создания у них основы иммунитета.
3. Гипериммунизация животных-продуцентов.
4. Приготовление сывороточных препаратов [50].

Существует два типа схем иммунизации животных-продуцентов:

- 1) иммунизация без введения адъювантов (вещества, стимулирующие образование антител);
- 2) иммунизация с адъювантами. Адъюванты могут использоваться любые, это зависит от предпочтения научных сотрудников и их целей в исследованиях.

В каждом конкретном случае схемы иммунизаций могут быть разными.

Не игнорируя значения вида, породности, возраста животных, качества рационов кормления, следует иметь в виду, что теоретически обоснованным и практически целесообразным является отбор продуцентов по иммунологическим показателям.

Цель иммунизации – это получение наивысшей ответной иммунологической реакции организма, а следовательно, и максимального увеличения в крови животных специфических антител, которое должно обеспечивать лечебный, профилактический и диагностический эффект препаратов. Иммунизация проводится через каждые 10 дней.

По окончании иммунизации, когда в сыворотке крови животного установлен максимальный титр специфических антител, проводят забор крови,

обычно через 7-10 суток после последней инъекции антигена и определяют в ее сыворотке наличие антител к тому антигену, с помощью которого в последующем готовят гипериммунную сыворотку. Выявление в сыворотке антител в титрах 1:800 и выше указывает на то, что данное животное может быть использовано в дальнейшем как продуцент для получения гипериммунной сыворотки.

Для приготовления гипериммунных сывороток чаще всего используют лошадей, крупный рогатый скот (волы), с целью приготовления диагностических гипериммунных сывороток чаще всего используют кроликов, птиц, реже овец, коз.

По окончании гипериммунизации, когда в сыворотке крови животного установлен максимальный титр специфических антител, у него берут кровь обычно через 7-10 суток после последней инъекции антигена.

Иммунизацию проводили подкожно вдоль спины в 3-4 точки в объеме 1 мл смеси. Кровь для исследования берут из ушной вены в объеме 5 мл за сутки до введения антигена, начиная с 1 иммунизации.

Кровь забирается в пробирки с активатором кровяного сгустка и отстаивается в течение часа при комнатной температуре для отделения сыворотки от сгустка. Полученная сыворотка освобождается от отдельных эритроцитов центрифугированием при 5 тыс. об /минуту 15 минут. До завершения исследования сыворотка хранится при -16°C .

На период всей иммунизации питание животных должно быть особым, необходимо кормить 3 раза в день, особое внимание нужно уделить воде, ее нужно в 2 раза больше, чем обычно. Место обитания животных должно быть чистым и сухим, при необходимости проветривать помещение для циркуляции воздуха [53,65].

Существует большое количество схем получения гипериммунных сывороток, однако оптимальным, по нашему мнению, является способ иммунизации с использованием адьювантов.

2. Объекты, материалы и методы исследования

2.1 Биологические объекты

При проведении исследований использовали микробную культуру *Y. pseudotuberculosis* O:3 и *Y. enterocolitica* O:3 сероварианта из музейной коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб».

Так же были использованы следующие культуры:

E. coli, *S. typhimurium*, *P. vulgaris*, *E. aerogenes*, *B. abortus*, а также *Y. pseudotuberculosis* O:1, O:4, O:5 и *Y. enterocolitica* O:9.

Для получения бактериальных взвесей культуру *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* выращивали на питательном агаре в лабораторных матрасах при 26 °С 48 часов.

Формализированные клетки микроорганизмов, дезинтегрированных мембраны *Y. pseudotuberculosis* (методики выделения клеток смотреть в подразделе 2.3).

2.2 Материалы

Оборудование:

При проведении исследований использовано современное оборудование:

Центрифуга Армед 80-2S, лабораторные электронные весы ВК-300, электрический суховоздушный термостат ТС1/20 СПУ, шкаф сушильный ШС-80 МКСПУ, микроскоп Biolar PI, автоматический фотометр Plate Screen Vet, фирмы «Hospitex Diagnostics», термошейкер PST-60 HLPlus, дозирование компонентов в реакции ИФА происходит многоканальным дозатором фирмы «Proline 720-240», установка для диализа, дистиллятор, УФ-облучатель, спектрофотометр, гемоанализатор, аналитические весы.

Лабораторные животные:

Для иммунизации использовались 12 кроликов, породы «Шиншилла», самцы, в возрасте 1,5 года и массой тела 2,5-3 кг. Кролики содержались в стационаре для животных УК №3 СГАУ им. Н.И. Вавилова, а также белые мыши в количестве 21 шт, масса тела которых была 20-22 г.

Химические реактивы и расходные материалы:

В исследованиях использовали соответствующие ГОСТам химически чистые и чистые для анализа реактивы отечественного производства, а также импортные реактивы, производимые фирмами: "Serva" и "Merck" (Германия); "Sigma" (США); "Pharmacia" (Швеция) и "Fluka" (Швейцария).

В качестве твердофазного носителя в ТИФА использовали 96-луночные полистироловые планшеты, производства фирмы "Linbro" (США).

Диализ проводили в диализном мешке ТЗ с размером пор 12-14 кДа производства "Orange Scientific" (Бельгия), для получения гипериммунных сывороток при иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда (ПАФ) и полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами галогенов (ПААГ).

Питательные среды:

Для культивирования бактерий использовали питательный агар, питательный бульон, выпускаемые предприятием ООО "НПЦ БиоКомпас".

Растворы:

Фосфатно-солевой буферный раствор:

К 1,2 л воды добавить 12 таблеток ФСБ. Дать раствориться, довести рН до 7,2-7,4 и добавить 0,6 мкм твина-20. Встряхнуть и использовать после того, как осядет пена.

Цитратно-фосфатный буферный раствор:

В 25 мл дистиллированной воды растворяют 0,96 г лимонной кислоты и 1,78 г Na_2HPO_4 . Доводят до рН 5,0-5,2. Перед тем, как ЦФБ внести в лунки необходимо добавить OPDA, растворенный в спирте.

Карбонатно-бакарбонатный буферный раствор (КББ):

В мерной колбе смешивают 65 мл 0,2 М раствора карбоната натрия с 185 мл 0,2 М раствора бикарбоната натрия и разбавляют водой до объема 1 л.

Бычий сывороточный альбумин:

Изготавливается исходя из количества плашек. Для 2 плашки: к 0,9 г сухого молока добавить 45 мл ФСБ. Перемешивать до полного растворения.

Субстратная смесь для ИФА:

0,01 г ортофенилдиамина растворяют в 25 мл ЦФБ pH=5,0-5,2 и добавляют к раствору 0,5 мл спирта. Смесь готовят за 10-15 минут до использования.

Стоп-раствор:

К 35 мл ФБС добавляют 10 мл H₂SO₄, происходит термическая реакция.

Физиологический раствор:

В 100 мл дистиллированной воды растворить 0,9 г NaCl.

Раствор тетразоля бромида голубого:

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

Диагностические препараты:

1. Конъюгат – иммуноглобулины антикроличьи класса G (целая молекула), полученные от козы, конъюгированные с пероксидазой хрена производства "Sigma" (США).

Экспериментальные препараты:

1. Дезинтегрированные мембраны *Y. pseudotuberculosis*, полученные на кафедре «Микробиология, биотехнология и химия» Саратовского ГАУ.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Культивирование бактерий

Для получения бактериальной массы проводили выращивание *Y. pseudotuberculosis* на питательном агаре в бактериологических матрасах при 26 °С в течение 2-3-х суток. Отмывали, полученную бактериальную массу двухкратно центрифугированием в физиологическом растворе при 5 тыс. об/мин 20 минут.

Полученная бактериальная масса хранится в замороженном виде и используется по мере накопления.

2.3.2 Получение мембранных оболочек микроба *Y. pseudotuberculosis*

Размороженная микробная масса в количестве 5 г суспензируется в 40 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия с рН=6,8. Взвесь подвергают ультразвуковой обработке на ультразвуковом дезинтеграторе типа UD-11 при 22 кГц в течение 8 циклов по 60 секунд и охлаждению между циклами по 90 секунд. При этом стакан с микробной взвесью охлаждают в ледяной бане. Во время работы дезинтегратора необходимо избегать образования аэрозоля (погружать излучатель вглубь взвеси, использовать глубокую посуду, опускать защитный кожух прибора, работать в боксе, периодически включать бактерицидные лампы и т.п.) и предохранять органы слуха. Дезинтегрированную бактериальную массу освобождают от не разрушенных клеток центрифугированием при 5 тыс.об./мин. за 15 минут. Надосадочную взвесь отбирают пипеткой и подвергают центрифугированию при 13 тыс. об./мин. на протяжении 60 минут. Цитоплазму и периплазму вместе с надосадочной жидкостью удаляют, а осадок, содержащий клеточные оболочки, ресуспензируют, объединяют и повторно осаждают.

2.3.3 Получение дезинтегрированных мембран

Y. pseudotuberculosis

Влажную массу клеточных стенок в количестве 1 г суспензируют в 10 мл 2%-го раствора додецилсульфата натрия (SDS-Na) на дистиллированной воде. Содержимое колбы инкубируют при температуре $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ на протяжении 20 ч с непрерывным перемешиванием. Не экстрагируемые компоненты из раствора белков с детергентом удаляют центрифугированием при 13 тыс.об./мин. в течение 60 минут. Освобождение от додецилсульфата натрия проводят диализом в течение одних суток в большом объеме 0,01М карбонатно-бикарбонатного буферного раствора (КББ), который необходимо менять 2-3 раза в сутки и постоянно перемешивать.

Для хранения дезинтегрированную суспензию разливают во флаконы по 1-2 мл и замораживают.

2.3.4 Получение гипериммунной сыворотки

Сыворотку получают подкожной иммунизацией кроликов вдоль спины в 3-4 точки в объёме 1 мл смеси антигена и ПААГ в соотношении 1:1. Проводят 9 иммунизаций с интервалом в 2 недели. Кровь для исследований берут из ушной вены в объёме 8-10 мл перед введением антигена, начиная после 5-й иммунизации. Рельефность сосудистой сети на месте взятия крови увеличивается обработкой ксилолом, остатки которого во избежание раздражения кожи немедленно удаляются тампоном, смоченным 70%-м этиловым спиртом. Кровь забирается в пробирки с активатором кровяного сгустка и отстаивается в течение часа при комнатной температуре для отделения сыворотки от сгустка. Полученная сыворотка освобождается от отдельных эритроцитов центрифугированием при 5 тыс. об /минуту 15 минут. До завершения исследования сыворотка хранится при -16°C .

2.3.5 Постановка иммуноферментного анализа

В полистироловый 96-луночный планшет вносится первый компонент: антиген, в данном случае дезинтегрированные мембраны, в количестве 100 мкл. Содержимое плашек ставят на шейкер при 37 °С в течение 1 часа.

Промывка планшета ФСБ осуществляется 3 раза в количестве 300 мкл раствора.

2. Добавление в лунки 2 % БСА, в количестве 200 мкл. Также плашки ставят на шейкер при 37 °С в течении 30 минут.

Промывка планшета ФСБ осуществляется 3 раза в количестве 300 мкл раствора.

3. Сыворотка вносится в лунки в количестве 100 мкл, плашки переносят в шейкер на 30 минут при 37 °С.

Промывка планшета ФСБ осуществляется 3 раза в количестве 300 мкл раствора.

4. Конъюгат добавляется в количестве 100 мкл и плашки с содержимом отправляют на шейкер при 37 °С на 30 минут.

Промывка планшета ФСБ осуществляется 3 раза в количестве 300 мкл раствора.

После последней промывки ФБС плашки готовы к учету результатов.

Перед тем, как поставить плашки в прибор, необходимо добавить ЦФБ в лунки в течение 5 минут в количестве 200 мкл для проявления реакции. По завершению 5 минут в лунки вносится стоп-раствор в количестве 100 мкл. Раствор вносится для предотвращения реакции.

Плашки отправляются на платформу прибора – спектрофотометра, где считываются результаты.

Результаты при спектрофотометрическом учете результатов содержимое лунок с отрицательным контрольным образцом (К-) используют в качестве нулевого контроля. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 450 нм и считают результат положительным, если коэффициент

поглощения светового потока исследуемого образца достигает величины не менее 0,05.

2.4 Схема эксперимента

На первом этапа эксперимента мы определяли антигенную активность ДМ *Y. pseudotuberculosis*.

Была проведена иммунизация белых мышей препаратом ДМ *Y. pseudotuberculosis*, вводили внутривбрюшинно белым мышам по 0,5 мл раствора в дозах: 500, 250, 125, 63, 31, 16 мкг на животное (по 3 мыши на дозу). Мышам 7 группы инъецировали 0,01 М фосфатный буферный раствор (отрицательный контроль).

Иммунизацию проводили двухкратно с интервалом в 10 дней. Через 10 дней после второй иммунизации проводили декапитацию мышей с извлечением из брюшной полости перитониальных макрофагов и взятием крови из перерезанных шейных сосудов.

Активность клеточного иммунитета определяли замером дыхательной активности перитониальных макрофагов по следующей схеме:

1. Извлечение макрофагов из брюшной полости мыши и их отмывка.
2. Подсчет количества макрофагов
3. Инкубация макрофагов в растворе тетразоля бромида голубого для накопления формазана.
4. Извлечение формазана из макрофагов диметилсульфоксидом.
5. Измерение концентрации формазана на спектрофотометре и расчет дыхательной активности макрофагов.

Активность гуморального иммунитета определяли по количеству антител в сыворотки крови методом иммуноферментного анализа, результаты приведены в таблице 1.

Дальнейший этап заключается в использовании ДМ *Y. pseudotuberculosis* совместно с ПААГ для получения иммунных сывороток крови с высоким содержанием специфических антител.

Была проведена 7-кратная иммунизация с интервалом в 2 недели.

Иммунизации проводили подкожно вдоль спины в 3-4 точки в объёме 1 мл смеси. При использовании адьюванта соотношение адьюванта к раствору антигена составляло 1:1. Кровь для исследования брали из ушной вены в объёме 5 мл за сутки до введения антигена, начиная с 1 иммунизации.

Из кроликов сформировали 16 групп:

1, 2, 3, 4 группы иммунизировались четырьмя дозами ДМ + ПААГ;

5, 6, 7, 8 группы – четырьмя дозами ДМ + ПАФ;

9, 10, 11, 12 группы – четырьмя дозами ПААГ + ФР (физиологический раствор).

13, 14, 15, 16 группы – четырьмя дозами ПАФ + ФР.

В каждой группе находилось по 3 животных. Результаты представлены в таблице 2.

Третий этап заключается в исследовании полученных гипериммунных сывороток крови кроликов в ИФА с цельными клетками иерсиний и другими представителями кишечной группы бактерий. Результаты приведены в таблице 3.

Раздел 3 Результаты исследования и их анализ

На первом этапе исследований мы определяли антигенную активность ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Для изучения антигенной активности необходима иммунизация животных с последующим изучением ответной реакции клеточной и гуморальной подсистем иммунитета. Поэтому нами была проведена иммунизация белых мышей препаратом ДМ *Y. pseudotuberculosis*.

Изменения клеточного иммунитета у иммунизированных мышей определялись нами по дыхательной активности их перитонеальных макрофагов, выделяемых из брюшной полости. Гуморальный иммунитет изучался наблюдением изменений титров специфических антител в крови мышей. В связи с отсутствием информации о величине оптимальной иммунизирующей дозы ДМ *Y. pseudotuberculosis* для белых мышей нами было иммунизировано несколько групп животных разными дозами препарата (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты иммунизации белых мышей ДМ *Y. pseudotuberculosis*

Иммунизирующие дозы ДМ, мкг/мышь	Реакция иммунной системы мышей	
	Дыхательная активность перитонеальных макрофагов	Антитела к ДМ
	Концентрация формазана на 1 макрофаг, г	Титры антител в ИФА с ДМ <i>Y. pseudotuberculosis</i>
500	$12,2 \cdot 10^{-10} \pm 1,4$	1: 12800
250	$11,6 \cdot 10^{-10} \pm 1,3$	1:12800
125	$10,4 \cdot 10^{-10} \pm 1,2$	1:6400
63	$8,7 \cdot 10^{-10} \pm 1,0$	1:6400
31	$5,8 \cdot 10^{-10} \pm 0,7$	1:3200
16	$3,0 \cdot 10^{-10} \pm 0,3$	1:1600
0 (контрольная)	$1,6 \cdot 10^{-10} \pm 0,2$	–

Как видно из данных, приведённых в таблице 1, ДМ *Y. pseudotuberculosis* способствуют значительной активизации клеточного и гуморального иммунитетов. Однако скорость прироста дыхательной активности перитонеальных макрофагов снижается при иммунизирующих дозах выше 63 мкг/мышь, а также замедляется антителообразование, что определяет величину иммунизирующей дозы в 63 мкг/мышь. При пересчёте на кролика массой 2,5 кг иммунизирующая доза составит 2 мг.

Дальнейший этап исследований предполагает использование ДМ *Y. pseudotuberculosis* совместно с ПААГ для получения иммунных сывороток крови с высоким содержанием специфических антител.

Известно, что высокая специфичность иммунных сывороток связана с наличием иммуноглобулинов класса G, которые в процессе иммунизаций постепенно вытесняют слабо специфичные иммуноглобулины классов M и A. Данный процесс завершается к 5 иммунизации.

Нами была проведена пятикратная иммунизация кроликов ДМ *Y. pseudotuberculosis* дозой 2 мг/животное для получения гипериммунных сывороток. В качестве препарата сравнения нами был использован полный адъювант Фрейнда (ПАФ), как один из наиболее эффективных из существующих адъювантов. Также ставились отрицательные контроли с адъювантами без антигена. Сыворотки крови получали от животных перед каждой иммунизацией и исследовали их в ИФА ДМ *Y. pseudotuberculosis*. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты определения антительной активности сывороток крови кроликов иммунизированных ДМ, при изучении их в ИФА с ДМ *Y. pseudotuberculosis* O:3

Время взятия сыворотки	Титры антител полученных сывороток в ИФА с ДМ 2 мкг/мл			
	ДМ+ПААГ	ДМ+ПАФ	ПААГ+ФР	ПАФ+ФР
До иммунизации	1:800	1:800	1:800	1:800
После 1 иммунизации	1:6400	1:6400	-	-
После 2 иммунизации	1:25600	1:51200	1:1600	1:1600
После 3 иммунизации	1:51200	1:102400	-	-
После 4 иммунизации	1:102400	1:204800	1:1600	1:3200
После 5 иммунизации	1:204800	1:204800	-	-
После 6 иммунизации	1:204800	1:409600	1:6400	1:6400
После 7 иммунизации	1:409600	1:409600	-	-

Из таблицы 2 видно, что максимального значения титр специфических антител в крови животных иммунизированных с использованием ПААГ достиг после 7 иммунизации (через 3,5 месяца) и составил 1:409600. По количеству антител и динамики роста их титров ПААГ не уступал ПАФ.

В контрольных группах высоких титров специфических антител отмечено не было, что свидетельствует о стимулирующем влиянии адъювантов на антителогенез только в сочетании с антигеном.

В процессе иммунизации также наблюдалось отсутствие соединительнотканых уплотнений подкожной клетчатки в местах введения ПААГ и наличие данных образований при использовании ПАФ.

Третий этап наших исследований предполагал исследование полученных гипериммунных сывороток крови кроликов в ИФА с цельными клетками иерсиний и других представителей кишечной группы бактерий. Это позволит более полно осуществить оценку специфичности полученных сывороток и рекомендовать их применение в качестве диагностических препаратов. Результаты испытаний представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты определения специфичности сывороток, полученных в опытных группах, при изучении их в ИФА с цельными клетками бактерий

Бактериальные клетки	Титры антител полученных сывороток в ИФА с клетками бактерий в разведении 10^9 клеток/мл	
	ДМ+ПААГ	ДМ+ПАФ
<i>Y. pseudotuberculosis O:1</i>	1:51200	1:51200
<i>Y. pseudotuberculosis O:3</i>	1:25600	1:51200
<i>Y. pseudotuberculosis O:4</i>	1:25600	1:25600
<i>Y. pseudotuberculosis O:5</i>	1:25600	1:51200
<i>Y. enterocolitica O:3</i>	1:200	1:200
<i>Y. enterocolitica O:9</i>	1:200	1:200
<i>E. coli</i>	1:400	1:400
<i>S. typhimurium</i>	1:100	1:100
<i>P. vulgaris</i>	1:400	1:400
<i>E. aerogenes</i>	1:200	1:200
<i>B. abortus</i>	1:400	1:400

Специфичность полученных гипериммунных сывороток была одинаковой при использовании обоих адьювантов. Титры антител полученных сывороток в ИФА с цельными клетками *Y. pseudotuberculosis* составили 1:51200-1:25600, с клетками *Y. enterocolitica* – 1:200, с клетками других представителей кишечной группы бактерий и бруцеллами – 1:100-1:400. Это свидетельствует о видовой специфичности антител.

Факт того, что положительные титры специфических антител *Y. pseudotuberculosis* в 500 раз выше положительных титров антител к другим видам бактерий, позволяет использовать полученные гипериммунные сыворотки при создании иммуноферментных тест-систем для диагностики псевдотуберкулёза (Таблица 3).

Заключение

Y. pseudotuberculosis и *Y. enterocolitica* широко распространены во всем мире и это является глобальной проблемой сельского хозяйства, поэтому необходимо проводить диагностику данного заболевания. Основными носителями возбудителя в природе являются мышевидные грызуны, а также зайцы и птицы (ласточки, вороны, голуби, сороки и т.д.).

Основной целью нашей работы было применение полиазолидинаммония в качестве адъюванта при получении гипериммунных сывороток крови к дезинтегрированным мембранам энтеропатогенных иерсиний.

В ходе эксперимента выяснилось, что ДМ *Y. pseudotuberculosis* активизируют гуморальные и клеточные подсистемы иммунитета.

С помощью адъювантов можно повысить титр сывороток, поэтому адъювант должен обладать стимулирующим действием и никак не влиять на организм иммунизируемого животного, такими свойствами обладает ПААГ – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами галогенов, что доказывают экспериментальные данные.

В результате проведения эксперимента по использованию полиазолидинаммония в качестве адъюванта при получении гипериммунных сывороток крови к дезинтегрированным мембранам энтеропатогенных иерсиний была проведена антигенная активность ДМ *Y. pseudotuberculosis* на белых мышах, использование ДМ *Y. pseudotuberculosis* совместно с ПААГ для получения иммунных сывороток крови с высоким содержанием специфических антител, а так же проведение иммунизации кроликов ДМ *Y. pseudotuberculosis* дозой 2 мг/животное для получения гипериммунных сывороток.

По результатам исследования было выявлено, что ДМ *Y. pseudotuberculosis* способствуют значительной активизации клеточного и гуморального иммунитетов, но скорость прироста дыхательной активности перитонеальных макрофагов снижается.

При иммунизации кроликов, полиазолидинаммоний показал себя с положительной стороны и было выявлено, что данный адъювант стимулирует, а главное увеличивает антителогинез.

Данная тема остается актуальной каждый год, ведь от быстроты и точности постановки диагноза зависит успех сельскохозяйственных предприятий по данным заболеваниям, поэтому необходимо своевременно диагностировать инфекции.

Нужно отметить, что использование ДМ *Y. pseudotuberculosis* в сочетании с ПААГ в качестве адъюванта для получения гипериммунных сывороток перспективно и можно рекомендовать данный способ на производство диагностических препаратов и тест-систем.

Выводы

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований можно сделать выводы:

1. введение животным ДМ *Y. pseudotuberculosis* активизирует гуморальную и клеточную подсистемы иммунитета;
2. использование 1%-го ПААГ в сочетании с ДМ *Y. pseudotuberculosis* позволяет получать гипериммунную сыворотку с высоким содержанием специфических антител;
3. полученная гипериммунная сыворотка обладает видовой специфичностью и может быть использована в диагностических целях;
4. по количеству антител и динамики роста их титров ПААГ не уступает ПАФ;
5. в местах инъекции ПААГ не наблюдается соединительнотканых уплотнений подкожной клетчатки.

Список источников литературы

1. Алгоритм лабораторной диагностики иерсиниозов / М.В. Чеснокова и др. // Дальневосточный журн. Инфекционной патологии. – 2010. – № 17. – С. 188-192.
2. Анисимов, А.П. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология / А.П. Анисимов // Медицина. – 2002. – № 4. – С. 3-11.
3. Актуальные проблемы эпидемиологии инфекционных болезней в Сибири / А. Д. Ботвинкин и др.; отв.ред. Г.Г. Онищенко. – М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. – 213 с.
4. Андрюков, Б.Г. Родо- и видоспецифические белки *Yersinia pseudotuberculosis*, их использование для конструирования диагностических препаратов / Б.Г. Андрюков: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Владивосток, 1999. – 24 с.
5. Алфредо, Э. Получение антигенов *Mycobacterium tuberculosis* и выявление наиболее значимых из них для диагностики туберкулеза: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / Э. Алфредо. – Казань, 2013. – 22 с.
6. Белая, О.Ф. Пути совершенствования лабораторной диагностики инфекционных заболеваний / О.Ф. Белая, С.Г. Пак // Вестник РАМН. – 2010. – № 11. – С. 50-53.
7. Бондаренко, В.М. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации / В. Бондаренко, Е. Рябиченко // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 1. – С. 92-100.
8. 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.

9. Бухарин, О.В. Инфекция – модельная система ассоциативного симбиоза / О.В. Бухарин // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – № 1. – С. 83-86.

10. Васильева, Ю.Б. Эпизоотология и инфекционные болезни животных / Ю.Б. Васильева, И.И. Богданов. – Ульяновск: УГСХА, 2015. – 25 с.

11. Васильев, Д. А. Методы общей бактериологии : учеб.-метод. пособие / Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Н. М. Никишина. – Ульяновск, 1998.

12. Возианова, Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни. В 3 т. Т.1 / Ж.И. Возианова. – Здоровье, 2000. – 497 с.

13. Возрастные особенности микробиоценоза кишечника у жителей г. Кемерово / Л.А. Леванова и др. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2001. – № 3. – С. 72-75.

14. Волков, Л.В. Роль плазмиды с молекулярной массой 82 MD при модуляции воздействия *Yersinia pseudotuberculosis* на пролиферативную активность лимфоидных клеток мыши / Л.В. Волков, Н.С. Бартенева, А.В. Пронин // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. – С., 1991. – № 12. – С. 29-32.

15. Воскресенская, Е.А. Новые подходы к микробиологическому мониторингу популяций *Yersinia pseudotuberculosis* и лабораторной диагностике псевдотуберкулеза: автореф. дис. д-ра. биол. наук: 03.02.03 / Воскресенская Екатерина Александровна. – СПб, 2014. – 40 с.

16. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз / Е.В. Шекунова, М.А. Ковалева, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2020. – Т. 10. – № 1. – С. 19-28.

17. Генетическая микробиология и совершенствование методов лаб. диагн. особо опасных инфекций / С.А. Еремин и др. – Саратов, 1991. – С. 55-62.

18. Дробот, Е.И. Реактивность клеток врожденного иммунитета при инфекции, вызванной разными плазмидными вариантами *Yersinia*

pseudotuberculosis: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Владивосток, 2015. – 22 с.

19. Егоров, А.М. Имуноферментный анализ / А.М. Егоров. – М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.

20. Есаулов, А.С. Бактериологический метод лабораторной диагностики: учеб. пособие / А.С. Есаулов, Н.Н. Митрофанова, В.Л. Мельников // Пенза: Изд-во ПГУ, 2015. – 84 с.

21. Знаменский, В.А. Этиология дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки / В.А. Знаменский, А.К. Вишняков // Ж. микробиол. эпидемиол., иммунобиол. 1967. – № 2. – С. 125.

22. Зооантропонозные инфекции: учебно-методическое пособие для студентов и магистров ветеринарной медицины и биотехнологии / сост.: Ю.Б. Васильев и др. – Ульяновск: УГСХА, 2015. – 119 с.

23. Зыкин, Л.Ф. Иерсиниоз и псевдотуберкулез сельскохозяйственных животных / Л.Ф. Зыкин, А.А. Щербаков, З.Ю. Хапцев. – Саратов, 2002. – 67 с.

24. Иванова, Л.К. Применение полимеразной цепной реакции при расследовании вспышки псевдотуберкулеза / Л.К. Иванова, А.П. Федянин, М.В. Чеснокова и др. // Генодиагностика инфекционных болезней: мат-лы Рос. науч.-практ. конф. – Новосибирская обл., 2005. – С. 183-187.

25. Иванова, Л.К. Возможности применения иерсиниозных сред обогащения в ПЦР-исследовании / Л.К. Иванова, В.Г. Малявин, О.Ю. Якунина и др. // Генодиагностика инфекционных болезней: мат-лы Рос. науч.-практ. конф. – Новосибирская обл., – 2005. – С. 181-182.

26. Методические подходы к расследованию вспышек псевдотуберкулеза / Л.К. Иванова, М.В. Чеснокова, В.Т. Климов, А.С. Марамович // Вторая науч.-практ. конф. с международ. участием. – Санкт-Петербург, 2006. – С. 76-77.

27. Иващенко, С.В. Технология создания ветеринарного диагностикума на основе мембранных белков бактерий / С.В. Иващенко // Современные

направления в диагностике, профилактике и терапии заболеваний животных: I междунар. науч.-практич. интернет-конф., Ставрополь // Вестник ветеринарии. – 2011. – Вып. 59. – № 4. – С. 64-65.

28. Иерсинии и иерсиниозы / О.А. Бургасова и др.; отв. ред. Г. Я. Ценёва. – СПб, 2006. – 168 с.

29. Инфекционные болезни животных / А.А. Бессарабов и др.; отв.ред. А.А. Сидорчук. – М.: Колос, 2007. – 671 с.

30. Каськов, Ю.Н. Современное состояние заболеваемости иерсиниозами на объектах железнодорожного транспорта России / Ю.Н. Каськов, Ю.И. Подпрыгоров, П.В. Кретов // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Матер. III Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2011. – С. 69-70.

31. Кишкун, А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике / А.А. Кишкун. – М.: ООО МИА, 2006. – 401-404 с.

32. Коляков, Я.Е. Ветеринарная иммунология / Я.Е. Коляков. – М.: Агропромиздат. – 1986. – 270 с.

33. Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней / С.В. Балахонов и др. // Псевдотуберкулез. – Саратов, 1998. – С. 144-165.

34. Мамлеева, Д.А. Эпизоотическое проявление паразитарных систем сапронозов в отдельных регионах РФ (на модели иерсиниоза): автореф. дис. д-ра. вет. наук: 16.00.03 / Д.А. Мамлеева. – Н. Новгород, 2008. – 43 с.

35. 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.

36. 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.

37. 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.

38. 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.

39. Зоонозные инфекции, с природной очаговостью, с позиции эпидемиологического и эпизоотологического диагнозов / А.А. Нафеев, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Ю.Б. Васильева // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной науки». – Ульяновск, 2015. – С.50-53.

40. Онищенко, Г.Г. Санитарно-эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации. Основные проблемы и приоритетные направления профилактической деятельности на современном этапе // Вестник РАМН. – 2009. – № 7. – С. 30-36.

41. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Сибири / Г.Г. Онищенко и др. // Здоровье населения и среда обитания. – 1999. – № 2. – 34 с.

42. Пат. 2518297 Российская Федерация, МПК С12Q1/04, С12N1/20. Тест-система для дифференциации видов и биотипов бактерий рода *Yersinia* / Е.А. Бигумильчик, Г.Я. Ценёва, Е.А. Воскресенская; заявитель и патентообладатель ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. – № 2012110981/10; заявл. 21.03.2012; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 16.

43. Пат. 2593012 Российская Федерация, МПК А61К39/00. Лекарственные препараты, содержащие антигены и антитела / В.М. Скорляков, С.В. Савина, Д.А. Зоярский, М.В. Трубкина; заявитель и патентообладатель ФГБОУВО «Саратовский Государственный Аграрный Университет им. Н.И. Вавилов». – № 2015104525/15; заявл. 10.02.2015; опубл. 27.07.2016, Бюл. № 21.

44. Туманский, В.М. Псевдотуберкулез: монография / В.М. Туманский. – Изд. 2-е, испр. и доп. – М. : Медгиз, 1959. – 82 с.
45. Псевдотуберкулез / И.А. Шурыгина и др. – Новосибирск: Наука, 2003. – 320 с.
46. Руководство по медицинской микробиологии. 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.
47. 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.
48. Применение твердофазного иммуноферментного анализа для серодиагностики псевдотуберкулеза / В.Б. Сбойчаков и др. // ЖМЭИ. 1986. – №7. – С.83-86.
49. Особенности штамма *Y. pseudotuberculosis* с плазмидой pVM 82, обнаруживаемой в очагах вспышек псевдотуберкулеза: Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология / И.С. Север, Т.С. Ильина, В.Я. Лютин, Г.Б. Смирнов // М. – 1991. – № 12. – С. 10-14.
50. СП 3.1.7.2615-10. Профилактика иерсиниоза. Санитарно-эпидемиологические правила, утверждённые Роспотребнадзором от 26.04.2010 г. № 37. – Москва, 2010. – 7 с.
51. Способ получения иммунных кроличьих сывороток к очищенным антигенам чумного микроба / И.М. Алутин, и др. // Вестник всесоюзн. микробиол. общества (Ростов, отдел.). – 1989. – Вып. 1. – С. 80-82.
52. СП 3.1.094-96. ВП 13.3.1318-96. Профилактика инфекционных болезней. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Иерсиниозы. Санитарные правила, утверждённые Госкомсанэпид-надзором России от 31.05.1996 г. № 11. Ветеринарные правила,

утверждённые Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия РФ от 18.06.1996 г. № 23. – Москва, 1996. – 8 с.

53. Тимченко, Н.Ф. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.Ф.Тимченко и др. – Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. – 219 с.

54. Тутов, И.К. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов / И.К. Тутов, В.И. Ситьков. – Ставрополь, 1997. – 253 с.

55. Хаджу, А. Совершенствование диагностики иерсиниоза и псевдотуберкулеза животных с использованием антител к диметилсульфоксид *Y. enterocolitica*: дис. канд. биол. наук: 06.02.02 / Хаджу Амар. Саратовский ГАУ, 2015. – 120 с.

56. Фенотипические особенности штамма *Yersinia pseudotuberculosis* с плазмидой pVM 82, обнаруживаемой в очагах вспышек псевдотуберкулеза / И.С. Север, Т.С. Ильина, В.Я. Лютин Г.Б. Смирнов // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. – 1991. – № 12. – С. 10-14.

57. Фримель, Г. Иммунологические методы / Г. Фримель.– М : Медицина, 1987. – 472 с.

58. Ценева, Г.Я. Иерсиниоз и псевдотуберкулез: пособие для врачей / Г.Я. Ценева. – СПб, 2006. – 168 с.

59. Шестакова, И.В. Хронический иерсиниоз как терапевтическая проблема / И.В. Шестакова, Н.Д. Ющук // Тер. арх., 2010. – № 3. – С. 71-7.

60. Шубин, Ф.Н. Плазмиды *Yersinia pseudotuberculosis* и их значение в реализации эпидемического процесса при псевдотуберкулезе / Ф.Н. Шубин, Ю.Т. Сибирцев, В.А. Рассказов // Журн. микробиол. – 1985. – № 12. – С. 53-56.

61. Шумилов, К.В. Современные данные об иерсиниозе животных / К.В. Шумилов, Л.П. Мельниченко, В.В. Селиверстов. – Ветеринария. – 2008. – № 4. – С. 7-13.

62. Ющенко, Г.В. Псевдотуберкулез и иерсиниоз: эпидемиологические и экологические аспекты // Инфекции, обусловленные иерсиниями (иерсиниоз, псевдотуберкулез), и др. актуал. инфекц.: Матер. междунар. конф. – С.-

Пб.: НИИЭМ им.Пастера, 2000. – С. 2.

63. Ющук, Н.Д. Особенности течения и отдаленные исходы генерализованной и вторично очаговой формы иерсиниозной инфекции / Н.Д. Ющук, И.В. Шестакова. // Леч. врач. – 2009. – № 11. – С. 82-6.

64. Якупов, Т.Р. Молекулярно-генетические и иммунохимические методы в диагностике, идентификации возбудителей туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота: автореф. дис. д-ра. вет. наук: 06.02.02 / Т.Р. Якупов. – Казань, 2011. – 49 с.

65. Allison, N.E. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects // Mol. Immunol. 1991. № 28. P. 279-284.

66. Aguilar, J.C. Vaccine adjuvants revisited / J.C. Aguilar, E.G. Rodriguez // Vaccine. – 2007. – № 25. – P. 3752-3762.

67. 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. – Vol. 69. – № 9. – P. 2107-2112.

68. 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. – Vol. 17. – № 2. – P. 315-319.

69. *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. – Vol. 76. – № 10. – P. 1704-1711.

70. David, M Webster Corrigendum to Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeutics / David M Webster, Padma Sundaram, Mark E Byrne // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2013. – Vol. 84, № 1. – P. 1-20.

71. Isberg, R.R. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells / R.R. Isberg, D. Voorhis, S. Falkow // *Cel.* – 1987. – Vol. 50. – № 5. – P. 769-778.

72. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach / M.P. Sory, A. Boland, I. Lambermont, G.R. Cornelis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – № 26. – P. 11998-12002.

73. Kathy D. Antibodies. Methods: [book 1] [Text] / Kathy D. - M.: Mir, 1991. – 287.

74. Kondakova, A. N. Structural studies of the O-antigens of *Yersinia pseudotuberculosis* O: 2a and mutants thereof with impaired 6-deoxy-D-manno-heptose biosynthesis pathway / A.N. Kondakova, N. Ho, O.V. Bystrova, A.S. Shashkov, B. Lindner, C. Creuzenet, Y.A.Knirel // *Carbohydrate research.* – 2008. – V. 343. – № 8. – P. 1383-1389.

75. Makino, S. et al. PCR – based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – V.32, №1. – P.65-69.

76. Modern vaccine adjuvants [Text] / Kwak L. W. [etal.] // *Canc. Chemother. Biother.* – 1996. – P. 749-763.

77. Pujol, C. The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia Pseudotuberculosis* / C. Pujol, J.B. Bliska // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol.71. – P. 589-600.

78. Prevalence and genetic diversity of enteropathogenic *Yersinia spp.* in pigs at farms and slaughter in Lithuania / A. Novoslavskij, L. Serniene, A. Malakauskas [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 2013. – Vol. 94. – № 2. – P. 209-213.

79. Pierson, D.E. The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing / D.E. Pierson, S. Falkow // *Infect. Immun.* – 1993. – Vol. 61. – № 5. – P. 1846-1852.

80. Slee, K.J. Enteritis in sheep and goats due to *Yersinia enterocolitica* infection / K.J. Slee, C. Button // Aust. Vet. J. – 1990. – Vol. 67. – № 11. – P. 396-398.

81. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica* / M. Iriarte, J.C. Vanooteghem, I. Delor [et al.] // Mol. Microbiol. – 1993. – Vol. 9. – № 3. – P. 507-520.

82. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses [Text] / Andres Mori, Ewa Oleszycka, Fiona A. Sharp [et al.] // European Journal of Immunology. – 2012. – Vol. 42, № 10. – P. 2709-2719.

83. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome / G.R. Cornelis, A. Boland, A.P. Boyd et al. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – Vol. 62. – P.1315-1352.

84. Skurnik, M. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae* / M. Skurnik, J.A. Bengoechea // Carbohydrate research. – 2003. – V. 338. – № 23. – P. 2521-2529

85. Valtonen, M. et al. Low levels of cytokines and endotoxin in a fatal case of myocardial depression and septic shock due to *Yersinia pseudotuberculosis* // Scand. Infect. Dis. – 1995. – V.27, №5. – P.533-535.

86. Vaxjo, A. Web-Based Vaccine Adjuvant Database and Its Application for Analysis of Vaccine Adjuvants and Their Uses in Vaccine Development [Text] / Samantha Sayers, Guerlain Ulysse, Zuoshuang Xiang [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2012. – Vol 10, Article ID 831486. – P. 13.

87. Vaccine manufacturing: challenges and solutions [Text] / B. U. Jeffrey, V. Ulrich [et al.] // Nature Biotechnology. – 2006. – № 8. – P. 1038-1045.

88. Vogel, F. R. Adjuvants in Perspective. Modulation of the Immune Response to Vaccine Antigens [Text] / F. R. Vogel // Dev. Biol. Stand. – 1998. – Vol. 92. – P. 241-248.

89. Wolf-Watz, H. Plasmid mediated virulence in *Yersinia* // Prog. Oct. Microbiol. Immunol. – 1987. – V.3. – P.159-178

90. Wohl, J.S. Canine Leptospirosis Compendium on Continuing Education / for the Practicing Veterinarian // J.S. Wohl. – 1996. – 18 (11), p. 1215-1225.

91. Tseneva, G. Y. Pseudotuberculosis in the Russian Federation/ G. Y. Tseneva, M.V. Chesnokova, V.T. Klimov, E.A. [et al.] // Advances in experimental medicine and biology. – 2012. – Vol. 954, Pt. 2. – P. 63-68.

92. Yang, Y. The psa locus is responsible for thermo inducible binding of Yersinia pseudotuberculosis to cultured cells / Y. Yang, J.J. Merriam, J.P. Mueller, R.R.Isberg // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64, № 7. – P. 2483-2489.