

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Казанская государственная академия  
ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

*на правах рукописи*

**АСХАТОВА НАТАЛЬЯ АНАТОЛЬЕВНА**

**АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИПЕПТИДОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ  
И РАЗРАБОТКА АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ЛИСТЕРИОЗА ЖИВОТНЫХ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:  
доктор ветеринарных наук,  
профессор Алимов А.М.

Казань – 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
1 ВВЕДЕНИЕ .....	4
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
2.1 Характеристика возбудителя листериоза.....	12
2.1.1 Культурально-биохимические свойства листерий.....	15
2.1.2 Морфология, состав и антигенная структура листерий.....	17
2.1.3 Генотипирование листерий.....	28
2.1.4 Методы дезинтеграции и фракционирования антигена и клеточных структур микроорганизмов.....	30
2.1.5 Аллергическая диагностика листериоза.....	36
3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40
3.1 Материалы и методы исследований.....	40
3.2 Результаты исследований.....	45
3.2.1 Изучение культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов листерий после длительного хранения.....	45
3.2.2 Определение вирулентности штаммов листерий после хранения.....	49
3.2.3 Ультразвуковая и химическая дезинтеграция листерий.....	51
3.2.4 Выделение аллергенов и изучение их аллергенных свойств...	57
3.2.4.1 Выделение аллергенов и изучение их свойств.....	57
3.2.4.2 Определение электрофоретических профилей полученных препаратов.....	64
3.2.5 Изучение аллергенных свойств и безвредности полученных препаратов (аллергенов).....	66
3.2.6 Изучение листериозного аллергена, полученного экстракцией додецилсульфатом натрия .....	74
3.2.6.1 Определение безвредности и активности на лабораторных животных.....	74
3.2.6.2 Испытание аллергена на крупном рогатом скоте.....	78

4	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	80
5	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	88
6	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	90
7	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	114

# 1 ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Существует множество методов диагностики инфекционных болезней животных и человека, но, несмотря на это, актуальной проблемой остается разработка наиболее достоверных и ускоренных методов. Своевременная и быстрая постановка точного диагноза того или иного инфекционного заболевания, дает возможность быстро его ликвидировать и минимизировать возможные негативные последствия инфекции, а именно, угрозу здоровью людей и экономический ущерб.

Листерия - это широко распространенная инфекционная болезнь, которая наносит большой ущерб животноводству и является серьезной угрозой здоровью людей [44,197]. В Российской Федерации ежегодно регистрируются от 40 до 100 случаев листериоза у людей при отсутствии эпидемических случаев [14,193], а также эндемические вспышки среди сельскохозяйственных животных [76]. Проблема борьбы с данной инфекционной болезнью обусловлена особенностями биологии ее возбудителя, наличием большого числа как патогенных, так и непатогенных штаммов, а также недостаточной изученностью генома и антигенной структуры микробных клеток [10,11,118,159].

Возбудитель листериоза выделен от более 90 видов диких и домашних животных, птиц, рыб, насекомых и клещей [14,100]. Основным источником возбудителя листериоза являются сельскохозяйственные животные - овцы, свиньи и крупный рогатый скот, а также дикие животные [43,119,175]. Способность длительного бактерионосительства среди животных приводит к высокому уровню контаминирования листериями пищевого сырья, продуктов его переработки [121,162]. Однако методы

выявления листерионосителей как среди животных, так и среди людей недостаточно разработаны.

Важно отметить, что листериоз является сапронозной инфекцией, при которой вегетативные клетки листерий могут переходить в L-формы, а также в некультивируемое состояние и длительно персистировать в организме и в объектах окружающей среды [5,156].

В организм человека и животных листерии проникают через слизистые оболочки рта, зева, глаз, кишечника и так же через поврежденную кожу [63,73,98].

Самым основным является алиментарный способ заражения, который в большинстве случаев связан с употреблением в пищу обсемененных продуктов питания [4,120]. Анализ случаев заболеваний людей листериозом показал, что в основном болезнь наблюдается у лиц группы риска, со сниженной резистентностью организма (новорожденные дети, беременные, пожилые) [70,169]. Начиная с 80-х годов прошлого века в результате многолетних эпидемических вспышек и спорадических случаев листериоза среди людей в ряде высокоразвитых стран, возникших в результате употребления готовых пищевых продуктов, данное заболевание стали рассматривать как пищевую инфекцию [68,187,171].

Большой спектр восприимчивых животных, а также людей, способность листерий относительно длительное время сохраняться во внешней среде и продуктах питания [69,74,95] говорят о необходимости дальнейшего, более подробного изучения природы возбудителя с целью разработки новых, более чувствительных и специфичных средств и методов идентификации патогенных бактерий рода листерий.

В настоящее время для выявления и идентификации *Listeria monocytogenes* используют микробиологические, серологические и биохимические методы, определение чувствительности к бактериофагам, а

также постановку биологической пробы на лабораторных животных. Комплексный и продолжительный по времени подход к диагностике листериоза, оправдывается стремлением к исключению возможных диагностических ошибок, которые могут возникнуть из-за таксономической схожести представителей бактерий рода листерий [13]. В этом аспекте значительную роль играют изучение антигенной структуры и генома возбудителя различных сероваров, а также изыскание эффективного аллергена и разработка аллергической диагностики листериоза и листерионосительства. Следует отметить, что аллергическая диагностика листериоза практически не разработана, хотя и известно формирование гиперчувствительности замедленного типа при разных инфекциях, в том числе при листериозе [20,82,186].

#### **Степень разработанности темы.**

Несмотря на то, что возбудитель листериоза был открыт почти 100 лет тому назад и его изучению посвящены многочисленные работы отечественных и зарубежных авторов [1,12,75,161], ряд вопросов остается недостаточно решенными.

Диагноз на листериоз ставят на основании комплекса эпизоотологических или эпидемиологических данных, клинических и патологоанатомических признаков, результатов лабораторного исследования, решающее значение принадлежит бактериологическому исследованию – выделению и идентификации культуры листерий [15].

Из-за многообразия клинического проявления, длительного листерионосительства и наличия антигенной вариабельности, а также отсутствия серопозитивности диагностика листериоза представляет определенные трудности. Практически не разработан аллергический метод диагностики и способы получения эффективных аллергенов. Недостаточно

сведений по белковому составу и характеристике генома листерий. В этом аспекте имеются лишь единичные сообщения о белковом составе, о характеристике генома и эффективности ПЦР для обнаружения генома листерий [6,116,88].

С учетом изложенного становится очевидным необходимость дальнейшего изучения биологических свойств листерий, их антигенов и аллергенной активности отдельных фракций полипептидов, а также разработка аллергической диагностики листериоза.

**Цель и задачи исследований.** Целью исследований явилось разработка способа получения специфического аллергена листерий и оценка эффективности аллергической диагностики листериоза.

Для достижения поставленной цели выдвинуты следующие задачи:

1. Освежить культуры листерий после длительного хранения в лабораторных условиях и изучить их культурально-морфологические и биологические свойства.
2. Определить электрофоретические профили полипептидов лизатов клеток разных штаммов листерий.
3. Получить разные фракции клеток листерий и определить их аллергенные свойства.
4. Разработать способ получения специфического аллергена и оценить диагностическую эффективность листериозного аллергена и аллергической внутрикожной пробы.

**Научная новизна.** Впервые проведены исследования по разработке метода получения специфического аллергена и аллергической диагностики листериоза, а также по фракционированию антигенов и полипептидов, оценке их аллергенной активности у разных штаммов возбудителя

листериоза и. Методом электрофореза в ПААГе в составе клеток листерий выявлено более 50 фракций с молекулярной массой от 10 до 70 кДа.

Установлено, что основные свойства возбудителя листериоза сохраняются при длительном хранении их путем посева и лиофилизированном состоянии. Листерии проявляют высокую устойчивость к действию ультразвука. Фракции листерий, полученные действием кислот и детергентов, проявляли высокую аллергенную активность. Показано, что вакцинация и заражение морских свинок и кроликов обусловлены развитием ГЧЗТ.

Наиболее эффективным и специфичным для аллергической ретроспективной диагностики листериоза оказался препарат, полученный экстрагированием додецил-сульфатом натрия. При постановки внутрикожной пробы с этим аллергеном, положительная аллергическая реакция коррелировала с листерионосительством.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследований расширяют знания по биологии и антигенной структуре возбудителя листериоза. Кислотные экстракты и лизаты листерий обладают аллергенной активностью и дают положительную реакцию ГЧЗТ у сенсibilизированных животных. Наиболее эффективным аллергеном, имеющим ретроспективное и диагностическое значение, является препарат, полученный экстракцией с ДДС-На с молекулярной массой около 10кДа.

Положительная внутрикожная проба с этим аллергеном профилирует с листерионосительством. Для ретроспективной диагностики листериоза с листерионосительства рекомендуется внутрикожная аллергическая проба с разработанным аллергеном.

Наиболее эффективным способом фракционирования полипептидов листерий является электрофорез в ПААГе лизатов, полученных обработкой

детергентной смесью. В их составе выявлялось более 50 фракций с молекулярной массой от 10 до 70 кДа.

Различные фракции антигенов листерий, полученные действием кислот и детергентов, проявляли специфическую аллергенную активность. Установлено, что вакцинация и заражение морских свинок и кроликов способствует формированию гиперчувствительности замедленного типа, которая выявляется постановкой внутрикожной пробы соответствующим и аллергенами, полученными из клеток листерий экстракцией различными методами.

Выявлено наличие определенной корреляции положительной аллергической реакции с листерионосительством, сформированной экспериментальным заражением животных сублетальными дозами.

**Методология и методы исследования.** Методология исследований основана на анализе имеющихся данных отечественных и зарубежных публикаций в области инфекционной патологии, изучения листериоза и его возбудителя. Для достижения цели и решения поставленных задач использованы микробиологические, иммунологические, биохимические, клинические, аллергические методы и метод статистического анализа. Опыты проведены с использованием значительного количества лабораторных животных, достаточного для получения адекватных и воспроизводимых результатов.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность и обоснованность результатов исследований, основных положений и научных выводов подтверждается большим объемом исследований, воспроизводимостью результатов, фактическими экспериментальными

данными, статистической обработкой цифровых материалов и комиссионными опытами.

Материалы диссертации доложены на ежегодных итоговых отчетах кафедры и научных конференциях:

Международная научно-практическая конференция «Инновационные решения в ветеринарной медицине, зоотехнии и биотехнологии в интересах развития АПК» (Казань, 2017);

Международная научно-практическая конференция «Современные научные исследования, актуальные вопросы, достижения и инновации в АПК», посвященная 145-летию академии (Казань, 2018);

Международная научно-практическая конференция «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК» (Казань, 2019);

Международная научно-практическая конференция «Физико-химическая биология как основа современной медицины», посвященная 110-летию со дня рождения В.А. Бондаренко (Беларусь, Минск, 2019).

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

- длительное хранение культур листерий путем пересевов и лиофилизированном состоянии обеспечивает сохранность их жизнеспособности и основных биологических свойств;
- листерии устойчивы к ультразвуку и легко лизируются детергентной смесью;
- в составе лизатов листерий выявляются более 50 полипептидных фракций с молекулярной массой от 10 до 70 кДа.;
- после вакцинации и экспериментального заражения листериями животных формируется ГЧЗТ, которая выявляется внутрикожной аллергической пробой со специфическим листериозным аллергеном;

- внутрикожная аллергическая проба со специфическим листериозным аллергеном для ретроспективной диагностики листериоза и листерионоительства.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 работ, из них 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 120 страницах, содержит 15 таблиц, 8 рисунков и 3 приложения. Список использованной литературы включает 198 источников, в том числе 85 иностранных.

## **2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **2.1 Характеристика возбудителя листериоза**

Листериоз – зоонозная инфекционная болезнь, которая имеет широкое распространение среди различных видов сельскохозяйственных и диких животных, представляет серьезную угрозу здоровью людей [42,67]. Листериоз зарегистрирован в 65 странах мира, как среди людей, так и среди животных [46,189].

Резервуаром и источником возникновения листериоза являются животные и объекты окружающей среды (вода, почва и др.) [22,32]. Листериозом заражаются многие виды домашних животных и птиц, отмечаются случаи инфекции у диких млекопитающих (грызуны, лисы, норки, еноты, копытные) и птиц (голуби). Возможно заселение бактериями рыб и морепродуктов. Выделение возбудителя происходит с испражнениями, слюной, молоком, спермой и др. [65,113].

Листерии не только длительное время сохраняются во внешней среде, но и способны размножаться при благоприятных условиях, например, в мертвых тканях и в силосе при низкой температуре; до 4 мес сохраняются в отрубях, овсе, сене, мясокостной муке, животноводческих помещениях [52,147]; длительное время не погибают в соленом мясе при низкой температуре [48,125]. При хранении в холодильнике при температуре 4 °С может происходить накопление листерий в продуктах питания (молоке, мясе и т. п.), при этом отмечалось повышение вирулентности листерий [51,195]. Лиофильно высушенные листерии сохраняли жизнеспособность в течение 7 лет [4,12].

Возбудитель листериоза проявляет относительно высокую устойчивость к физико-химическим факторам. Листерии погибают от

действия 5 %-ного раствора лизола или креолина через 10 мин; 2,5 %-ном раствора формалина или гидроокиси натрия – через 20 мин; раствора хлорной извести при содержании 100 мг активного хлора – в течение часа, 400 мг/л – за 10 мин. Нагревание до 100°C убивает листерии через 5 мин, до 75 – 90 °C – через 1ч. Содержание в суспензии белка способствует повышению их устойчивости.

Восприимчивы к листериозу овцы, козы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, кролики, куры, гуси, утки, индейки. Болеют животные всех возрастов, но особенно чувствителен молодняк и беременные животные [51,151]. Чаще всего болеют овцы, однако есть сообщения из других стран о преимущественном поражении и крупного рогатого скота [117,160].

Листерии выделены от многих видов диких животных. Отмечены случаи заболевания кошек, собак, обезьян, пушных зверей, форелей (в рыбопитомниках). Листерий выделяли из птиц, иксодовых и гамазовых клещей [11,181].

Источником возбудителя инфекции при листериозе являются больные животные, выделяющие листерии во внешнюю среду с истечением из носа, половых органов (при абортах), с абортированным плодом, калом, мочой, молоком (при листериозных маститах) [105,167]. Однако листерии могут длительное время находиться во внешней среде, размножаться при благоприятных условиях, поэтому листериоз рассматривают как «сапроноз» [40,93,126].

Распространению болезни могут способствовать мышевидные грызуны. В циркуляции возбудителя листериоза между дикими (в частности, грызунами) и домашними животными некоторую роль могут играть паразитические клещи [185].

Листериионосительство установлено (в желудочно-кишечном тракте) у клинически здоровых животных (и людей) по различным источникам – от

5 до 90% [12,54,163]. Использование фекалий и навоза для удобрения полей и огородов приводит к контаминации овощей (для людей) и кормов (особенно силоса для животных). Часто сообщают о случаях болезни животных после поедания инфицированного силоса. В некоторых странах листериоз даже называют «силосной болезнью» [4,184].

У овец болезнь носит сезонный характер и проявляется преимущественно с января по май. Это обусловлено активизацией факторов передачи возбудителя инфекции (миграция инфицированных грызунов к хранилищам кормов, преобладание силоса в рационе животных) и снижением резистентности организма животных. У крупного рогатого скота и свиней сезонности листериоза не обнаружено [14,58,177].

Листериоз проявляется спорадически, реже в виде эпизоотий и энзоотий. Отмечена стационарность болезни из-за длительной сохраняемости листерий во внешней среде, наличия животных-листериионосителей, а также существования природных очагов листериоза, где возбудитель поддерживается в дикой фауне и различными путями передается сельскохозяйственным животным [6,55,145].

Отмечены энзоотические вспышки листериоза в разных странах у людей после употребления контаминированных продуктов (сыры, мясные изделия, замороженные овощи и др.) [35,148].

Таким образом, обобщая приведенные данные, можно констатировать, что листериоз имеет широкое распространение среди домашних и диких животных, поражает многие виды и представляет большую угрозу здоровью людей как пищевая инфекция. Высокая устойчивость возбудителя во внешней среде и способность их размножаться в различных объектах и листерионосительство способствуют существованию природных очагов листериоза.

### 2.1.1 Культурально-биохимические свойства листерий

Возбудитель листериоза аспорогенные, палочковидные (коккоподобные), грамположительные, хемоорганотрофные, факультативно-анаэробные бактерии из семейства корине-бактерий, подвижные в молодых культурах, выращенных при комнатной температуре. Методы окраски – наиболее простой метод, по Граму. Срок культивирования (ежедневный просмотр) до 3-4 суток. Имеют форму коротких прямых палочек (размером 0,4–0,5 x 0,5–2 мкм), с закругленными концами. Располагаются одиночно, попарно, часто в виде римской цифры V, либо короткими цепочками (из 3-5 клеток), реже – в молодых культурах в виде длинных нитей. Листерии не образуют спор и капсул, могут внедряться в клетки и формировать L - форму, способствуя латентному течению инфекции [96,114]. Для инфекции оптимальный уровень pH – 7,1 ..7,4. На питательных средах дает мелкие (1-2 мм), гладкие, плоско-выпуклые, удлиненной или нитевидной формы колонии, полупрозрачные, голубовато-серые (в проходящем свете) и зеленые (при косом освещении). R-колонии характеризуются утолщенным зазубренным краем и грубозернистой массой, достигающей 1,5-3 мм. При выращивании на жидких средах культура дает равномерное помутнение с последующим выпадением осадка, который при встряхивании поднимается в виде «косички». На полужидких средах рост колоний (более обильный у поверхности) происходит по уколу. На печеночном агаре колонии имеют слизистую консистенцию, на кровяном агаре вокруг колоний образуется узкая зона гемолиза. Культура имеет запахи творога или молочной сыворотки, что обусловлено накоплением продуктов углеводного обмена [3,24,91,150].

Листерии устойчивы во внешней среде. Растут в широком интервале температур (от 1 до 45°C) и pH (4÷10). При 4–6°C (температура бытового холодильника) листерии способны размножаться в мясе, молоке, масле, сыре, других продуктах, а также в почве, воде, на растениях и в трупных тканях. В различных кормах бактерии сохраняют жизнеспособность до 3 лет [90]. Поэтому при их выделении рекомендуют метод «холодного обогащения», то есть посеvy выдерживать при +4°C длительное время, что способствует их накоплению [141].

Клетки листерий подвижны при 20-25°C. Листерии ферментируют глюкозу, левулезу, рамнозу, дисахариды (мальтозу), полисахариды (декстрин), гликозиды (салицин); к манниту и крахмалу инертны. Расщепление сахаров сопровождается образованием кислоты, но не газа [8]. Содержат цитохромы и фаголизабелен [59]. Бактерии обладают гемолитической активностью. Слабая, едва уловимая гемолитическая активность может быть усилена использованием CAMP-теста. Листериязная культура в большинстве случаев является каталазоположительной и оксидазоотрицательной, но необходимо учитывать, что если питательные среды содержат низкие концентрации мясного и дрожжевого экстракта, то возможна отрицательная каталазная реакция. Активность каталазы подавляется на средах, содержащих высокую (более 10%) концентрацию глюкозы [78,138].

Реакция с метил-ротом и Фогес-Проскауэра положительна [81].

Листерии не разжижают желатин, не гидролизуют казеин и молоко. Индол не продуцируют, на обычных питательных средах чаще всего, не образуют сероводород [60,61]. Алимов А.М. доказал, что способность листерий продуцировать сероводород зависит от наличия в питательной среде серосодержащих аминокислот – цистеина, цистина [2]. Н.Э. Шафикова, А.М. Алимов установили [108], что при инкубации листерий в

фосфатном буфере они проявляют низкую интенсивность теплопродукции. После внесения в этот буфер не утилизируемых углеводов (сахароза, лактоза, дульцит, инулин, сорбит), выделение тепла листериями повышалось в 1,5 – 2,0 раза. Однако в присутствии легко ферментируемых углеводов (глюкоза, фруктоза, мальтоза) – их теплопродукция превышала в 8-15 раз по сравнению с таковой в безуглеводной среде [107].

Обобщая выше изложенное, следует отметить, что возбудитель листериоза обладает определенными факторами вирулентности, высокой ферментативной и биохимической активностью и способен размножаться в при широком диапазоне температуры и рН на разных питательных средах и субстратах.

### **2.1.2 Морфология, состав и антигенная структура листерий**

Листериязная клетка так же, как и другие клетки бактерий, состоит из клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, нуклеиновой кислоты. Клеточная стенка листерий имеет гладкую, слегка извилистую конфигурацию и типичное для грамположительных бактерий трехслойное строение [62, 122]. Внешний и внутренний слои более плотные и относительно тонкие, толщиной в 30-35 А. Средний слой более широкий, губчатого строения толщиной в 90-120 А, в толще его проходят поперечные каналы. Общая толщина клеточной стенки варьирует в пределах 200- 280 А. Согласно исследованиям, клеточная стенка листерий имеет 3 слоя и толщина 2-х крайних темных слоев равна 30-35 А, а толщина светлого, промежуточного слоя определяет в 240 А, при общей толщине клеточной стенки, примерно в 340 А. По-видимому, толщина клеточной стенки листерий имеет штаммовые различия. Общая толщина клеточной стенки у вирулентных листериязных штаммов 9-127, 9-129 достигает 200-250 А, при

толщине двух крайних слоев по 30-35 А и среднего слоя 79-90 А [60,69,70,89,98]. У слабовирулентного листериозного штамма «А» общая толщина клеточной стенки достигала 400 А при толщине двух крайних слоев по 70-100 А и промежуточного слоя 180-200 А. Цитоплазматическая мембрана отделена от клеточной стенки пространством шириной 30-45 А. В этом пространстве проходят многочисленные поперечные мостики, которые соединяют клеточную стенку и внешний плотный слой цитоплазматической мембраны [79,186]. Сама цитоплазматическая мембрана также имеет 3-х слойное строение. Внешний и внутренние слои варьируют по толщине от 25 до 37 А, а средний слой от 20 до 25 А. Общая толщина цитоплазматической мембраны составляет 85 и 100 А [85,101]. Однако результаты исследований структуры цитоплазматической мембраны разноречивы. Отдельные исследователи не отрицают трехслойного строения цитоплазматической мембраны, но утверждают, что толщина всех слоев одинакова и колеблется в пределах 30-35 А. По данным [19,34,80,165] цитоплазматическая мембрана состоит из 3-х плотных слоев (каждый толщиной около 25 А) и двух светлых (толщиной равной 30А каждый). Позднее не подтвердили эти данные и предположили, что авторы в структуру цитоплазматической мембраны включают промежуточный слой, отделяющий ее от клеточной стенки.

Отмытая цитоплазматическая мембрана, свободная от цитоплазматического материала осмотически лизированного протопласта *Listeria*, содержала 55-60 % белка, 1 % рибонуклеиновой кислоты, 0,1 % дезоксирибонуклеиновой кислоты, 1,3- 2,3 % углеводов, 0,17-0,38 % аминокислот, 0,2-0,4 % рамнозы, 3,5-4,0 % фосфора, 10,5-12,0 % азота и 30-35 % липидов. Аминокислотный состав мембраны отличался от таковой клеточной стенки тем, что серосодержащие аминокислоты в ней отсутствовали. Глюкоза, галактоза, рибоза и арабиноза входят в состав

мембраны. Мембранный липид содержал 80-85 % фосфолипидов и 15-20 % нейтрального липида – фосфолипид фосфатидилглицеринового типа. На основании изучения 33 штаммов *L. monocytogenes*. Установлено наличие у всех штаммов высокого процента C12 – насыщенной жирной кислоты, имеющей структуру разветвлённой цепи [36,127,194]. Основными элементами являлись насыщенные C14, C16 и C17 – разветвлённые цепи жирных кислот. Другие насыщенные кислоты (C15, и C22), находятся в концентрациях менее 10 %. Некоторые жирные кислоты могли быть обнаружены в очень небольших количествах. [84] при изучении липидов *Listeria* установили, что эта бактерия содержит 6-7 % (сухой вес) растворимых в хлороформе липидов. Диглицериды составляют большую часть фракции нейтрофильных липидов. Полярные липиды в основном состоят из фосфолипидов фосфатидил-глицеринового типа и гликолипида, содержащего глюкозу и галактозу. Основные классы липидов содержат те же жирные кислоты, хотя не в той же пропорции. Преобладают жирные кислоты с разветвлёнными цепями (C15, C17), изоокислоты и прямолинейные кислоты присутствуют в меньшем количестве, ненасыщенных кислот не обнаружено. Известно влияние культуральной среды и температуры культивирования на содержание липидов в клетках 5-ти разных штаммов *L. monocytogenes*. Бактериальные клетки *Listeria* при пониженных температурах производят больше липидов, чем при повышенных [28,192].

При изучении аминокислотного состава различных штаммов листерий установлено, что в их гидролизатах обнаруживаются 17 аминокислот [2]. Качественный и количественный аминокислотный состав различных штаммов не имеет существенных отличий. Однако содержание глюкозамина в вирулентных штаммах было в 1,5 – 2 раза больше, чем у вакцинного штамма АУФ.

Алимовым А.М. [2] методом механической дезинтеграции листерий и последующего дифференциального центрифугирования были получены клеточные стенки и жгутики *Listeria monocytogenes*.

По антигенным свойствам различают 2 серологические группы, объединяющие различных в антигенном отношении листерий. По наличию термолабильных жгутиков (H) и термостабильных соматических (O) антигенов листерии подразделяют на 4 серологических типа (1-4), причем типы 1,3 и 4 подразделяются на подтипы (a-e) [64,66,170].

Листерии имеют антигенное родство со стафилококками, энтерококками, сенной палочкой и особенно с возбудителем рожи свиней (эризипеллоид), что затрудняет серологическую диагностику болезни. Листерии образуют фаги, по которым выделяют 9 фаготипов (фаговаров) [81,168].

Для возникновения инфекционного процесса возбудитель должен обладать способностью к внедрению, сохранению и размножению в макроорганизме, повреждая клетки, ткани и подавляя активность иммунной системы, т.е. факторами вирулентности [164].

Факторы патогенности листерий:

- интерналин - мембранный белок, облегчающий проникновение бактерий в макрофаги и эндотелиоциты. Бактерии способны мигрировать из фаголизосом и вегетировать в цитоплазме клеток.

- листериолизин O - гемолизин, вызывающий повреждение мембран фаголизосом; считается основным фактором вирулентности.

- фосфолипазы листерий вызывают растворение клеточной мембраны и проникновение в клетки, в том числе и макрофаги (что защищает возбудитель от действия АТ). Дочерние популяции связывают и

полимеризуют актин инфицированных клеток, что нарушает подвижность макрофагов и приводит к их аккумуляции в кровотоке (моноцитоз) [180].

У бактерий имеются Н-, О- и К-антигены [96,109,176].

Н-антиген - жгутиковый - связан с сократительным белком жгутиков - флагеллином. Термолабилен, разрушается при 56 - 80°C. После обработки фенолом сохраняет свои свойства.

О-антиген – соматический. Этот антиген связан с клеточной стенкой бактерий. Термостабилен, сохраняется при кипячении 1-2 часа.

К-антиген – капсульный. Располагается более поверхностно, чем О-антиген и часто его маскирует. Для выявления О-антигена, необходимо кипячением разрушить К-антиген. К-антигены полисахаридной природы выявлены у пневмококков. У сибиреязвенных бацилл К-антиген – полипептид. К К-антигену относится Vi-антиген брюшнотифозных бактерий, обладающих высокой вирулентностью [18,45,166].

Протективный антиген – термолабильный белок, обладающий сильно выраженными иммуногенными свойствами. Такой антиген выделен из отечной жидкости сибиреязвенного карбункула. Протективные антигены образуют возбудители чумы, бруцеллеза, туляремии, коклюша [23,133].

Антигены разных возбудителей используются для получения вакцин и диагностических препаратов, которые используются для идентификации микроорганизмов по антигенной структуре [13,157].

Еще в начале XX века были сделаны попытки изучения антигенной структуры листерий [33]. В настоящее время твердо установлено серологическое различие типов листерий в связи с неоднородным их антигенным строением [56,182].

Применив метод точного анализа соматического (О) и жгутикового (Н) антигенов, заимствованным из практики серологической диагностики салмонеллезом, С. Патерсон [167] обнаружил, что листерии имеют сложную

антигенную структуру: 5 соматических и 4 жгутиковых антигена. Он различал 4 основных серотипа листерий.

В результате своих исследований Патерсон [178] пришел к выводу, что связь между серологическим типом и зоологическим видом хозяина отсутствует, так же как нет связи между типовой принадлежностью и географическим распространением. Дальнейшие исследования подтвердили правильность его данных и позволили уточнить и упростить предложенную им схему [178].

Таблица 1 – Антигенная структура и типовая принадлежность *Listeria monocytogenes* (по Патерсону)

Тип	Жгутиковые антигены (H)	Соматический антиген (O)
1	AB	I II III
2	BD	I II III
3	AB	II IV III
4	ABC	V III

Уточненная схема антигенов *Listeria monocytogenes* (по Зеелигеру и Лизенмейру) выглядит следующим образом [181].

Таблица 2 - Антигенная структура и типовая принадлежность *Listeria monocytogenes* (по Зеелигеру и Лизенмейру)

Серотипы	Оригинальный номер штамма	Диагностически важные	
		O-факторы	H-факторы
1	2	3	4
1	7973	I II	A, B

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
2	5348	I II	B, D
3	5105	II IV	A, B
4a	5214	V a, b	A, B
4b	10071/53	V a, c	A, B, C

Донкер - Вот считает, что тип 4 можно разделить на 5 подтипов (a, b, c, d, e).

Таблица 3 – Деление 4-го серотипа на подтипы (по Донкер- Вот)

Подтип	Соматический антиген	Жгутиковый антиген
4a	V, VII, IX (III)	ABC
4b	V, VI, (III)	ABC
4c	V, VII (III)	ABC
4d	V, VII, VI, VIII (III)	ABC
4e	V, VI, VIII, IX (III)	ABC

Для проведения серологической типизации листерий необходимо иметь:

а) О- и Н (или ОН -) – антигены для гипериммунизации животных и насыщения сывороток;

б) монорецепторные сыворотки.

О- антигены изготавливают путем выращивания культур листерий на печеночном глюкозо-глицериновом агаре при температуре 37°C в течение 24 часов. Смывают культуру с агара фосфатно-буферным раствором хлористого натрия (рН 7,4) и кипятят в течение 1-2 часов в водяной бане для

разрушения Н-антигена (жгутикового). Концентрацию взвеси устанавливают 3 млрд. микробных тел в 1 мл, консервируют фенолом до 0,5 % при конечном разведении. Для исключения спонтанной агглютинации О-антигены можно обработать ультразвуком [25,168].

Н-антигены получают путем попеременного выращивания культуры: вначале в МПБ в течение 14-16 часов при температуре 22-24°C, затем 5-6 часов при температуре 37°C. После этого высевают культуру на печеночный глюкозо-глицериновый агар, содержащий 0,03 % теллурита калия, и выращивают 16-18 часов при комнатной температуре, затем 6-7 часов при температуре 37°C и до 72 часов при комнатной температуре. Культуру смывают с агара фосфатно-буферным раствором во флаконы с бусами и шуттелируют 40 часов, затем центрифугируют 30 минут. Надосадочную жидкость инактивируют 0,3%-ным раствором формалина и используют в качестве антигена [130,140].

ОН- антигены получают путем выращивания культуры листерий при комнатной температуре на сильно увлажненном агаре, консервируют 0,3%-ным раствором формалина или же выращивают культуру листерий 18-20 часов при комнатной температуре в фосфатно-буферном МПБ с 1% глюкозы и консервируют ее 0,25%-ным раствором формалина [172].

Для получения сывороток гипериммунизируют кроликов путем введения интравенозно антигенов с промежутком 3-4 дня. О-сыворотку консервируют 0,5%-ным фенолом, Н(ОН) – сыворотку - 50%-ным глицерином или мертиолятом в разведении 1:10000. Перед гипериммунизацией сыворотку крови кроликов следует проверить на наличие листериозных антител. При обнаружении титра РА выше 1:80 животных не следует использовать в опыте [87,132].

Монорецепторные сыворотки получают путем адсорбции соответствующими антигенами. Для этого к осадку антигена, полученному

центрифугированием, добавляют сыворотку, разведенную 1:25, ставят в термостат на 24 часа при температуре 37°C и затем на 18-20 часов при температуре 4°C. Адсорбцию повторяют до тех пор, пока не получают отрицательную реакцию агглютинации с антигеном, взятым для адсорбции [134,173].

Адсорбцию сывороток следует производить по следующей схеме.

Таблица 4 – Схема адсорбции монорецепторных сывороток

О-фактор сыворотки	I, II	О-сыворотка против 1-го серотипа насыщалась ОН-антигеном 4-го типа
	I	О-сыворотка 1-го типа насыщалась ОН-антигеном 3-типа
	IV	О-сыворотка 3-го типа насыщалась ОН-антигеном 1-го типа
	V	О-сыворотка 4-го типа насыщалась ОН-антигеном 2-го типа
Н-фактор сыворотки	AB	ОН-сыворотка 1-го типа насыщалась О-антигеном 1-го типа
	A	ОН-сыворотка 1-го типа насыщалась ОН-антигеном 2-го типа
	D	ОН-сыворотка 2-го типа насыщалась О-антигеном 1-го типа
	C	ОН-сыворотка 4-го типа насыщалась О-антигеном 4-го типа и Н (или ОН) – антигеном 1-го типа

Техника исследования. Серологическую типизацию штаммов проводят с помощью пробирочной или пластинчатой (на стекле) реакции агглютинации. О-агглютинацию в пробирках учитывают после 4-18 часов выдерживания в водяной бане при температуре 50°C, затем следует выдержать несколько часов в холодильнике при температуре 4°C. Н-агглютинацию учитывают спустя 2-4 часа после пребывания в водяной бане при температуре 50°C и 15-30 минут выдержки при комнатной температуре [99,143].

Если штамм агглютинируется I, II и III сыворотками, то он принадлежит к типу 1 или 2; типовую принадлежность его устанавливают реакцией Н-антигена с сыворотками А, В и D. Если штамм агглютинируется I, II сывороткой, но не III сывороткой, то он принадлежит к 3-му типу.

Если штамм не агглютинируется I, II и IV сыворотками, но агглютинируется V сывороткой, то он принадлежит к 4-му серотипу.

О.В. Петров [83] разработал серологический метод направленной изменчивости соматической антигенной структуры, позволяющий получать моноклональные О-сыворотки без использования адсорбции агглютинов. Метод заключается в выращивании типовых штаммов листерий на средах, содержащих агглютинирующую О-сыворотку другого типа до полного устранения групповых О-антигенов.

К.Н. Шлыгина [110] типизировала 84 отечественных штамма листерий, среди которых преобладали листерии 1-го серотипа, реже – 4-го серотипа. Листерии 2-го и 3-го серотипов не установлены. Выявлены также варианты листерий 1-го серотипа. Типизированы 92 штамма, выделенные в Томской, Новосибирской, Московской, Ленинградской и Иркутской областях. 88,6% штаммов были отнесены к 1-му серотипу. Остальные штаммы имели отклонения в антигенной структуре и поэтому не могли быть отнесены ни к одному из известных серотипов [16].

Проведенная Зеелигером серологическая типизация значительного числа штаммов листерий показала, что во Франции, Германии, Венгрии, Финляндии, Швеции, Голландии и Швейцарии преобладает серотип 1. Среди выделенных штаммов только некоторые принадлежали к серотипу 4в [46].

Штаммы 1-го серотипа были выделены преимущественно при листериозных энцефалитах, 4-го серотипа – при септических формах болезни, 5-го серотипа – только из абортированных плодов овец. В связи с тем, что листерии 1, 2 и 3-го серотипов имеют определенное антигенное родство, автор рекомендует для практической диагностики пользоваться общим для них антигеном из штаммов 1-го серотипа. Следовательно, для постановки диагноза нужно обязательно иметь два антигена (1-го и 4-го серотипов), имеющих групповой характер, и соответственно две специфические сыворотки [46].

Чрезвычайно перспективными являются работы по выделению листериозного бактериофага. Сврд и Пикет, применяя облучение штаммов листерий ультрафиолетовыми лучами, получили листериозный бактериофаг, который они использовали при типизации штаммов. Оказалось, что чувствительность к фагу совпадала с серотипом штамма, но не совпадала с источником его выделения [190]. М.К. Щеглова выделила листериозный бактериофаг и получила обнадеживающие результаты при экспериментальной листериозной пневмонии у белых мышей. При этом установлено, что листериозный бактериофаг повышал фагоцитарную активность лейкоцитов. По сообщению автора, бактериофаги оказались высокоспецифичными, они лизировали листерии и не оказывали действия на возбудителей дифтерии. С помощью изготовленной антифаговой сыворотки удалось выявить листерии там, где посевы оказались

стерильными, т.е. повысить процент высеваемости листерий при бактериологических исследования [11,190].

### 2.1.3 Генотипирование листерий

Результаты первых экспериментов по ДНК/ДНК гибридизации, проведенные *H. J. Welshimer* показали, что *L.monocytogenes* является гетерогенным. Тем не менее, количество ДНК-гибридизационных групп в их коллекции штаммов нельзя было установить, поскольку меченой являлась лишь одна ДНК *L.monocytogenes*; кроме того, не были указаны серовары [196]. В 1982 году были предприняты дальнейшие исследования по ДНК/ДНК гибридизации с использованием большого количества (29) штаммов различного происхождения, направленные на выяснение вопроса о геномной гетерогенности так называемых *L. monocytogenes* и оценку обоснованности выделения новых видов *L. bulgarica* и *L. innocua*, в то время не получивших официального утверждения. Среди штаммов, ранее идентифицированных как *L. monocytogenes*, было выявлено, пять генетических групп [72,197].

Генетическая группа 1 с типовым штаммом *L. monocytogenes*, соответствующим *L. monocytogenes* в строгом смысле слова включала штаммы, относящиеся к сероварам 1/2a, 1/2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 [102,149,188].

Генетическая группа 2 включала штаммы с высокой гемолитической активностью, которые относились к серовару 5, подтверждая предположения Иванова о принадлежности этих штаммов к отдельному виду с наименованием «*L. bulgarica*»; в 1985 году они получили название *L.*

*ivanovii*. Дальнейшие исследования штаммов данного вида с использованием мультилокусного энзимэлектрофореза, ДНК/ДНК-гибридизации и рестрикции гена рРНК, позволили описать два подвида: *L. ivanovii* подвид *ivanovii* (рибозоположительный) и *L. ivanovii* подвид *londoniensis* (рибоза-отрицательный) [39,41,139].

Генетическая группа 3 содержала штаммы сероваров 4ab, 6a, 6b и необозначенные серовары, которые не обладали гемолитической активностью и патогенностью для мышей, включая два штамма, ранее предлагаемые *H. P. R. Seeliger* в качестве референс-штаммов *L.innocua*. Данная группа штаммов соответствовала *L.innocua*, и этот вид был официально утвержден[39,153].

Генетическая группа 4 содержала негемолитические штаммы серовара 6a и 6b. Эти штаммы вырабатывали кислоту из D-ксилозы и являлись непатогенными для мышей и, таким образом, соответствовали группе штаммов, ранее описанных у *Groves* и *Welshimer*. Группе были присвоены статус вида и название *L.Welshimeri* в 1983 году [140,196].

Генетическая группа 5 включала в себя гемолитические и непатогенные штаммы различных сероваров (1/2c, 4c, 4d, 6b и необозначенные серовары) и впоследствии была названа *L.seeligeri*. Полученные результаты были подтверждены в экспериментах по ДНК/ДНК-гомологии (оптический метод) в 1993 году. Нумерические таксономические исследования подтвердили, что *L.monocytogenes*, получившие определение в восьмом издании Руководства по таксономической бактериологии Берджи, не являлись одним-единственным таксоном [115,146]. Тем не менее, данный метод имеет ограниченную чувствительность в отношении бактерий, отличающихся небольшим количеством характеристик, при этом данные исследования малоэффективны при определении гетерогенности. Любопытно, что эта

новая геномная классификация была проверена с использованием мультилокусного энзимэлектрофореза (исследовано 18 ферментных локусов). Исследование матричного кластера генетических дистанций у парных электрофоретических типов показало, что каждый из видов *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* и *L. seeligeri* соответствовал одному-единственному, не перекрывающемуся другими, кластеру [30,137].

Таким образом, при изучении геномов различных штаммов современными методами выявлена генотипическая неоднородность листерий. У возбудителя листериоза - *Listeria monocytogenes* генетической группы 1 выявлены штаммы разных сероваров.

#### **2.1.4 Методы дезинтеграции и фракционирования микроорганизмов**

Методы дезинтеграции микроорганизмов можно разделить на такие как химические, физические и химико-ферментативные [111].

Физические методы дезинтеграции - это обработка ультразвуком, замораживание-оттаивание, вращение лопасти или вибратора, осмотический шок, баллистическое разрушение, продавливание с помощью пресса, измельчение твердой замороженной клеточной массы, декомпрессия (сжатие с резким снижением давления) [53].

Ультразвуковая обработка наиболее эффективный метод для разрушения структур клеток. Данный метод может быть использован для выделения внутриклеточных материалов [147].

Обработка ультразвуком попеременно генерирует волны высокого и низкого давления в исследуемой суспензии бактерий. В цикле низкого давления волны ультразвука создают мелкие вакуумные пузырьки, лопающиеся во время следующего цикла высокого давления. Это явление

носит название кавитации. В этот момент происходит взрыв кавитационных пузырьков, который вызывает сильные гидродинамические силы сдвига.

Данное возникновение этих сил сдвига, разделяет клеточный материал, имеющий волокнистую структуру, на мелкие частицы высвобождая много внутриклеточное содержимое. Кроме того, материал клеточной стенки разрушается на очень мелкие частицы.

Этот эффект можно использовать для ферментации, выщелачивания и процессов преобразования органических веществ. После измельчения и разрушения ультразвуковая обработка обеспечивает выход большого количества внутриклеточного материала, который содержит и фрагменты стенок клеток.

Метод, в котором бактерии разрушаются силами сдвига, образующимися в момент, когда суспензии клеток встряхиваются или перемешиваются вместе с маленькими стеклянными или пластмассовыми шариками обозначают термином "баллистическое разрушение" [76].

В прошлые годы применялись два устройства - аппарат для встряхивания, насаживаемый на ось центрифуги типа *International*, и аппарат Микля. Однако ни один из них не обеспечивал поддержание низкой температуры в момент встряхивания, в связи с чем приходилось часто останавливать процесс, чтобы охлаждать пробу. Данные устройства уже не выпускают в промышленности, их заменили тканевым дезинтегратором Брауна. Такой дезинтегратор, поставляется многими фирмами в США, которые специализируются на изготовлении лабораторного оборудования. Дезинтегратор имеет контейнер для проб объемом 65 мл, который с частотой 2000-4000 колебаний/мин качается в горизонтальной плоскости. За счет струи жидкого CO<sub>2</sub>, направляемой к контейнеру с пробой, обеспечивается охлаждение. Чаще всего, случаев клетки подвергаются разрушению в течение 3-6 мин при температуре ниже 4 °C [47].

Дезинтегратор Брауна применяется в случае, если необходимо отделить клеточные стенки и отдельные ферменты из бактерий Грам+. При этом пользуются имеющийся методикой Ворка: исследуемую бактериальную суспензию (30 мл с содержанием сухого вещества 20-50 мг/мл) в буфере смешивают с 20 мл шариков *Ballotini* №12 в специальном контейнере (важно оставить для воздуха объем не менее 20%). В течение 0,5 мин через аппарат пропускают CO<sub>2</sub> для охлаждения контейнера. Далее в течение 3,5-5 мин в зависимости от вида бактерий пробу с частотой 3000 движений в минуту интенсивно встряхивают. Затем шарики удаляют посредством низкоскоростного центрифугирования и фильтрования. В некоторых случаях в опытах используют вместо стеклянных шариков пластмассовые, это сводит к минимуму возможную денатурацию белков. При описанной выше методике с целью выделения стенок клеток, пробу после встряхивания сразу же подвергают обработке для инактивации автолитических ферментов [86].

Такой метод, как замораживание – оттаивание, используют, чтобы сделать грамтрицательные клетки чувствительными к лизоциму или детергентам. Метод обычно применяют при выделении в больших количествах мембран или органелл клеток [94].

С целью выделения большого количества клеточных мембран используют следующую методику. Концентрированную суспензию специально отмытых клеток в 0,02 М трис-буфере, рН 7,8, содержащую 5 мМ ЭДТА, 0,25 М сахарозы и 0,5 мг/мл лизоцима, вносят в колбу и подвергают замораживанию тонким слоем, периодически поворачивая колбу в подготовленной ацетоновой бане с сухим льдом. Далее суспензию подвергают размораживанию, погружая в емкость с теплой водой. Как только все растает, вносят в 20 объемов специального холодного буфера, в составе которого: 0,02 М трис, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мг/мл

дезоксирибонуклеазы, рН 7,8. Получившаяся смесь обрабатывают ежеминутно, около 20 с в ножевом микроизмельчителе, для измельчения ДНК и разрушения клеток.

Клетки, которые не подверглись разрушению, удаляют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. При наличии большого количества осадка, исследуемый материал вновь суспензируют в указанном ранее растворе трис-ЭДТА-сахарозы и снова повторяют цикл замораживания - оттаивания с последующим разведением.

Метод продавливания с помощью пресса представляет самый распространенный и самый полезный способ разрушения клеток. Определенное количество суспензии бактерий (объемом примерно от 5 до 40 мл - до 30 % об. клеток) помещают в плотно пригнанный поршень стальной цилиндр. Этот цилиндр имеет маленький выпускной клапан с узким отверстием, с которым соединена выводящая трубка. Стальной цилиндр с имеющимся поршнем ставят под гидравлический пресс массой 10-тонн. По мере опускания поршня, бактерии разрушаются под воздействием гидродинамических сил, которые возникают в момент прохождения клеточной суспензии в отверстие выпускного клапана. Преимущества данного метода:

- 1) Отсутствуют проблемы с охлаждением, поскольку цилиндр и поршень пресса охлаждают заранее, а нагрев происходит в момент прохождения клеток через отверстие клапана. Поскольку температура вытекающей жидкости в этот момент повышается на 5-10°C, ее можно быстро охладить, если ее собирать в металлический стакан или пробирку, помещенные в ледяную баню.

- 2) Разрушение происходит мгновенно, и исследуемая суспензия разрушенных клеток не подвергается лишним гидродинамическим силам, которые могут повредить субклеточные единицы клеток [158].

Пресс Френча - установка состоит из цилиндра, поршня, выпускного клапана, подающего нагрузку. В прошлых моделях такого пресса использованы быстро изнашивающийся клапан со стальной иглой, который быстро изнашивался во время работы. В настоящее время используют клапан с подогнанным по размеру нейлоновым шариком, который позволяет поршню доходить до конца цилиндра и не вызывать повреждений, за счет чего и обеспечивается более однородное разрушение. Также удобно использовать гидравлический пресс с приводом от мотора, такой пресс устанавливают на постоянное возращение в диапазоне скоростей движения поршня. При использовании данной установки, исследуемую суспензию клеток помещают в цилиндрическую ячейку и устанавливают под гидравлический пресс. На поршень ячейки опускается поршень пресса, до момента максимального усилия. До наступления данного момента, выпускной клапан закрыт. Далее очень медленно открывают его, пока поршень не начнет медленно опускаться вниз. Для разрушения клетки суспензируют в объеме буфера [0,01 м HEPES (M-2-гидроксиэтилпиперазин-M'-2-этансульфоновая кислота), pH 7,4 при 0°C], составляющим 0,1 объема взятой культуры. Добавляют небольшое количество рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы (0,1 мг/мл). Суспензию разрушают на прессе Френча под давлением от 14 до 107 Па. Далее добавляют  $MgCl_2$  до конечной концентрации 1 мМ и удаляют неразрушившиеся клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин.  $Mg^{2+}$  необходим для того, чтобы функционировала дезоксирибонуклеаза; его добавляют после разрушения, для предотвращения стабилизации рибосом [98].

Осмотическим шоком называют разрушение клеток, вызванное помещением их в гипотоническую или гипертоническую среду. Этот метод применяется для разрушения бактериальных клеток, которые имеют не

прочную и высокопроницаемую оболочку. Это обуславливается возникающим солевым шоком. Оболочка клетки, органеллы, вирусы за счет проникающей внутрь клетки воды, разрываются от сильного давления. Предварительно клетки суспендируют в буферной гипертонической среде, которая имеет в своем составе ЭДТА. Далее смесь быстро переносят в холодную гипотоническую среду, центрифугируют, а надосадочную жидкость удаляют. ЭДТА добавляется с условием подвергнуть разрушению липополисахаридов стенок бактерий. Осмотический шок у определенного количества бактерий может наступить при внесении согретой культуры в холодную среду разбавителя.

С целью непрерывной дезинтеграции бактерий имеются методы, которые основанные на принципе декомпрессионной дезинтеграции. Этот метод основан на том, что бактериальные клетки изначально насыщают газом под давлением с целью выравнивания парциального давления с каждой стороны оболочечного барьера. Далее необходимо перевести бактериальные клетки в зону нормального давления. В связи с чем возникает градиент давления, который направлен во внешнюю среду. Это и приводит к разрушению оболочек микроорганизмов [23].

Таким образом, для дезинтеграции микроорганизмов предложены различные технологии, основанные на физических и механических принципах. Одни из них требуют соответствующего оборудования, другие трудоемкие достаточно и так далее, то есть имеют ряд существенных недостатков. Поэтому для биохимических исследований наиболее пригодными являются химические методы: использование кислот, щелочей, детергентов, лизоцима и др. Однако при этом возникают проблемы с хранением нативности изучаемого материала, тем не менее, многие химические методы достаточно эффективны и широко применяются.

### 2.1.5 Аллергическая диагностика листериоза

Аллергия – (*allos* – «иной», *ergon* – «действие») – качественно измененная реактивность организма на действие антигенного раздражителя, характеризующаяся повышением чувствительности организма к какому-либо веществу, а также сопровождающаяся повреждением структуры и функции клеток, тканей и органов [9].

В основе аллергии лежит повышенная и измененная способность организма реагировать на повторное поступление в организм аллергенов. Аллергические реакции, обусловленные антигенами возбудителей инфекционных заболеваний, называют инфекционной аллергией [77]. Состояние аллергии является одной из фаз формирования иммунитета. Одной из форм иммунного ответа выступают реакции гиперчувствительности замедленного типа, которые возникают при инфекционной патологии имеют не только патогенетическое, но и диагностическое значение [9].

Аллергическая диагностика инфекционных болезней основана на выявлении повышенной чувствительности тканей организма к специфическим аллергенам. На введение аллергена инфицированный организм отвечает аллергической реакцией, которая протекает как местное явление (гиперемия, отек, болезненность), но и общей реакцией [129].

Наиболее распространенным методом аллергической иммунодиагностики являются кожные пробы [31].

Листериоз – зоонозное заболевание, имеющее разнообразное проявление: ангинозное-септическое, глазо-железистое, нервное с явлениями менингита, менингоэнцефалита, септицемии и латентное течение и листерионосительство. Полиморфизм картины листериоза и биологические

особенности возбудителя создают определенные трудности в диагностике [37,183].

Основу лабораторной диагностики составляют бактериологический и серологические методы, а за последние годы они могут быть дополнены ПЦР. Однако, несмотря на высокую чувствительность и специфичность, ПЦР при листериозе для пожизненной диагностики не всегда может быть эффективной, так как возбудитель может быть локализован во внутренних органах [144]. Серологические реакции также не всегда коррелируют с листерионосительством. Для ретроспективной диагностики отдельные исследователи считают целесообразным применение аллергической пробы [89,131]. Тем не менее, отсутствие достаточно эффективного аллергена сдерживает при применении аллергической диагностики при листериозе.

Первые попытки использования аллергической диагностики были предприняты К.Н. Шлыгиной [110], которая приготовила аутолизаты бульонных культур листерий 1-го и 4-го серотипов. Препарат вводили морским свинкам внутрикожно в дозе 0,1 мл. Аллергическая перестройка у зараженных животных обнаруживалась с шестого дня после введения культуры листерий и сохранялась в течение месяца. В положительных случаях реакция проявлялась в виде отчетливой гиперемии и инфильтрации кожи через 18-20 часов после введения аллергена и удерживалась до 48 часов, после чего наступало ее угасание [110].

*М.В. Manzano* [155] установил, что при введении фильтрата культуры листерий в плантарную поверхность лапки мышей, выздоравливающих от первичного заражения листериозом, обнаруживается ярко выраженная реакция туберкулинового типа, которая появлялась через 6-8 часов и достигала своего максимума через 24 часа после введения фильтрата. У контрольных мышей никакой ответной реакцией не было.

По данным В.В. Сливко [90], для диагностики листериоза может быть применен аллергический метод. С этой целью автор изготовил аллерген – двухсуточную бульонную культуру возбудителя листериоза, убитую нагреванием при 100°C в течение 2 часов. Этот препарат вводили внутривенно по 0,2 мл. У экспериментально зараженных лабораторных животных положительная аллергическая реакция обнаруживалась с пятого дня заболевания. Автор предполагал использовать указанный препарат для прижизненной диагностики листериоза и листерионосительства.

Обобщая немногочисленные сообщения по аллергической перестройке организма при листериозе, можно констатировать, что при этой инфекции так же, как при других, возможно фракционирование ГЧЗТ, которая может быть выявлена аллергической пробой. Однако для установления возможности аллергической диагностики листериоза и листерионосительства необходимы дополнительные исследования как по разработке способа получения специфического аллергена, так и разработка аллергической диагностики листериоза.

Представленный обзор, позволяет констатировать, что возбудитель листериоза представляет серьезную угрозу здоровью людей, поражает многие виды животных. Несмотря на интенсивные исследования возбудителя и заболевания, вызываемого им, ряд вопросов диагностики листериоза и биологии возбудителя остаются недостаточно изученными. Поэтому изучение антигенов листерий, их аллергенных свойств и разработка аллергической диагностики листериоза остаются недостаточно разработанной, особенно ретроспективная диагностика и выявление бактерионосительства. Следует отметить, что аллергические реакции при инфекционной патологии рано возникают и длительно сохраняются. Поэтому они могут быть использованы для ранней диагностики, в отличие от серологических реакций, а также для ретроспективной диагностики и

выявления бактерионосителей. В этом аспекте значительный практический интерес представляет разработка способа получения специфического аллергена и аллергической диагностики листериоза.

### 3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Материалы и методы исследований

Опыты проводили на кафедре биологической и неорганической химии, межкафедральной лаборатории иммунологии и биотехнологии при ФГБОУ ВО «Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана» в период с 2015 по 2019 годы. Отдельные работы, в частности, по пересеву культур, наработке биомассы и заражение животных проводили в лаборатории биохимии и молекулярно-генетических исследований ФГБНУ ФЦТРБ-ВНИВИ, сотрудникам которой выражаем благодарность.

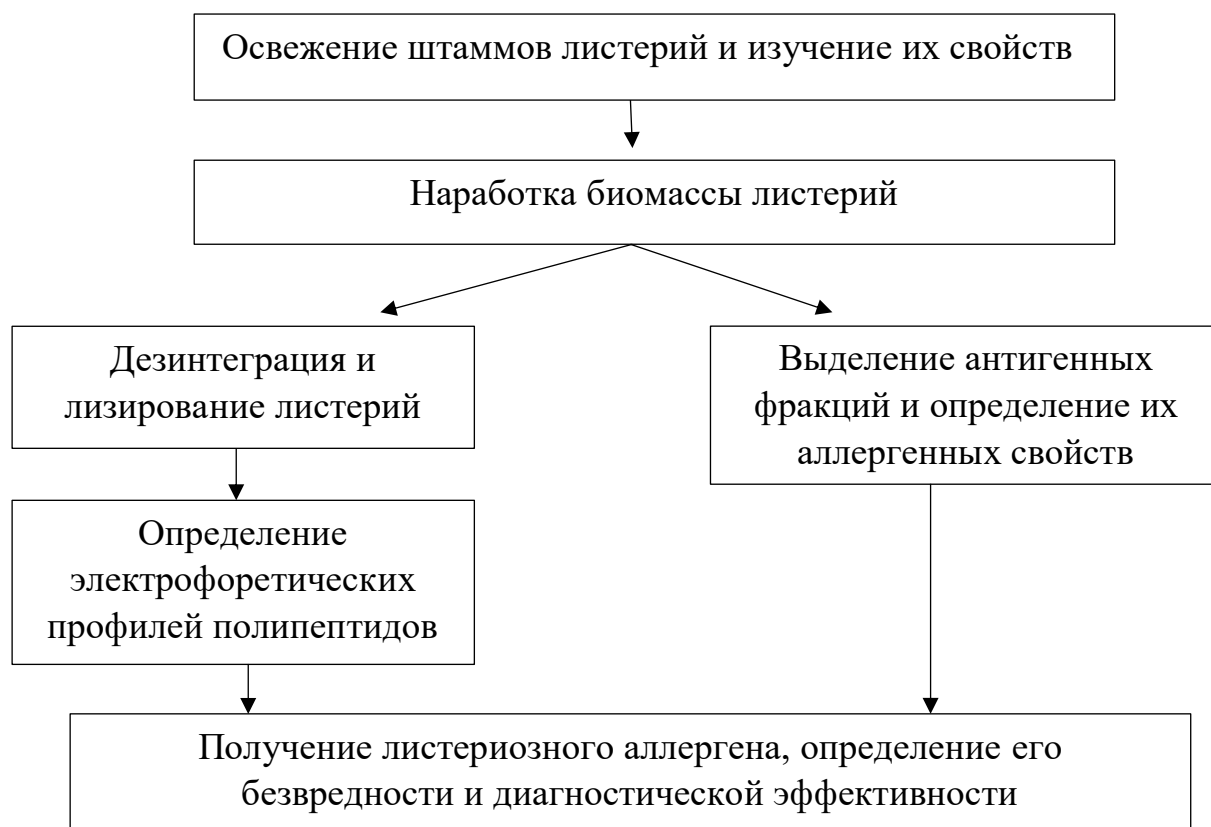


Рисунок 1 - Общая схема исследований

В опытах использовали (*Listeria monocytogenes*): вакцинный штамм–АУФ, референтные (9-127, 9-128, 9-129, 9-130) и эпизоотические (Т-71, 2797) штаммы – первого и второго серотипов, выделенные от различных животных в разных регионах страны, а также вакцинный штамм *Salmonella* ТС-171.

Вышеперечисленные штаммы поддерживали на среде Китта-Тароцци под вазелиновым маслом, путем периодических пересевов. Кроме того, вакцинный штамм АУФ хранили в лиофилизированном состоянии во флаконах, заполненных азотом.

Лиофилизация была произведена в сахарозо-желатиновой среде. Жидкие и лиофилизированные штаммы листерий хранили при температуре + 4°С в условиях холодильника [1,2].

Исследуемые штаммы освежали путем посева в мясопептонный бульон. Затем производили посевы на питательные среды (с гидролизатом лактоальбумина, МПБ и МПА Хоттингера).

Рабочие культуры штаммов *Listeria monocytogenes* хранили в лаборатории на полужидком мясо-пептонном агаре (0,2%) при температуре 4°С. Пересевы производили каждые 4 месяца.

Морфологические свойства культур изучали путем микроскопирования мазков, окрашенных по Граму. Ферментативную активность определяли на средах Гисса.

Бактериальную массу исследуемых штаммов листерий получали культивированием на агаре Хоттингера с 0,4% глюкозой. Посевы инкубировали при 39°С в течение 48 часов. Затем биомассу смывали стерильным физиологическим раствором натрия хлорида. Дважды

отмывали от остатков питательной среды путем центрифугирования этим же раствором. В дальнейшем биомассу использовали для исследований.

Концентрацию микробных клеток определяли по бактериальному стандарту, а при необходимости путем подсчёта КОЕ после посева на агар Хоттингера с 0,4% глюкозой.

Для получения аллергенных фракций использовали кислотный и щелочной гидролиз по методу Цуверкалова в описании Шапиро и Денисова [106] и Рунова [86], экстракцию ДДС-Na. Кроме того проводилась ультразвуковая дезинтеграция.

Ультразвуковая дезинтеграция клеток листерий. Для разрушения бактериальных клеток суспензию листерий с концентрацией 20 млрд. микробных клеток (по бактериальному стандарту) в 1 мл озвучивали ультразвуковым дезинтегратором УЗДН-2Т2 с излучателем 35 кГц, при силе тока 0,3 А и подмагничивании 5. Объем бактериальной суспензии 10 см<sup>3</sup>. Озвучивание проводили при поверхностном погружении излучателя. В кожух стакана подавали водопроводную воду для охлаждения с температурой 20 °С. В данном режиме бактериальную суспензию озвучивали в течение 20, 40, 60 и 80 минут. Степень разрушения микробных клеток контролировали микроскопией мазков, окрашенных по Граму и по оптической плотности на фотоколориметре КФК 1-2 М. Неразрушенные микробные клетки удаляли центрифугированием при 4000 об/мин 30 мин. Надосадочную жидкость использовали для электрофореза.

В следующих сериях опытов лизис клеток проводили обработкой детергентной смесью, состоящей из додецилсульфата натрия (5%), глицерина 12,5% и меркаптоэтанола (1,25%) в 0,125 М растворе трис-HCl буфере pH 5,8 при 100°C в течение 5 мин.

Разделение полипептидов листерий проводили путем электрофореза по *U. Laemmli* [152] в полиакриламидном геле с 0,1 % додецилсульфатом

натрия с линейным градиентом 7-16% акриламида. На каждую лунку наносили лизаты с содержанием 100 мкг белка, определенного по методу Лоури [154]. Электрофореграммы фиксировали 50% этанолом и окрашивали раствором Кумасси R-250. В качестве маркерных белков использовали фосфоорилазу (М.м. – 97,4 кДа), бычий альбумин (М.м. - 69 кДа), цитохром С (Мм -12 кДа).

Электрофоретическую разгонку полипептидов в ПААГе проводили в течение 3 часов при силе тока 50 мА на пластину полиакриламидного геля в вертикальном аппарате «*Bio-Rad*» в присутствии 0,1 % раствора додецилсульфата натрия. В качестве красящей метки к пробам добавляли бромфеноловый синий. По окончании электрофореза пластинки геля фиксировали смесью метанол - уксусная кислота – вода (20:10:70) в течение 22-24 часов. Затем их окрашивали 0,1% раствором Кумасси бриллиантовым синим R-250 и обесцвечивали погружением в раствор 10% уксусной кислоты.

ДНК из бактериальной массы листерий, выращенных на агаре Хоттингера с 0,4% глюкозой в течение 48 часов, выделяли по методу Р.Р. Вафина в соавт. (2002г) [1,29]. Для этого культуры листерий смывали с поверхности питательной среды физиологическим раствором хлористого натрия. Бактерии осаждали центрифугированием при 5000 g 20 минут. Осадок ресуспензировали в физиологическом растворе и еще раз центрифугировали. Полученный осадок разводили физиологическим раствором до концентрации 10 млн. микробных клеток в 1 мл. Затем 0,5 мл этой суспензии переносили в пробирки Эппиндорфа и центрифугировали. Полученный осадок ресуспензировали в 200 мл ТЕ-буфера. К этой суспензии добавляли 5 мкл 10н раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирок смешивали, переворачивая несколько раз в течение 3-5 сек. После этого для нейтрализации в пробирки вносили 50 мкл 2 М трис-HCl буфера,

р Н 7,4 и центрифугировали при 5000 д в течение 10 мин для удаления неразрушенных клеток. Затем надосадочную жидкость, содержащую ДНК листерий, переносили в сухие пробирки Эппиндорфа.

Окончательно белки удаляли обработкой фенол-хлороформом и хлороформом. ДНК осаждали добавлением 2,5 объема 96% этанола при комнатной температуре. Затем ДНК осадок промывали 2 раза 70% этанолом путем центрифугирования. Наконец, осадок ДНК растворяли в дистиллированной воде и использовали для постановки ПЦР.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на СФ-46. Режим проведения ПЦР отрабатывали путем варьирования температуры и времени фаз денатурации, отжига и синтеза.

Для надежности обнаружения листерий в исследуемых объектах методом полимеразной цепной реакции важно, чтобы используемые праймеры позволяли амплифицировать фрагменты ДНК независимо от антигенных различий циркулирующих штаммов. В связи с этим дальнейшие опыты были направлены на установление пригодности разных праймеров для обнаружения ДНК штаммов листерий I и II серогрупп.

Полимеразную цепную реакцию для обнаружения листерий ставили с праймерами Mar1, Mar5 и L1, L2, синтезированных фирмой «Литех» по нашему заказу, набора для ПЦР анализа, изготовленного ЦНИНЭ МЗРФ. Эти праймеры имели следующую нуклеотидную последовательность:

Mar1 5'- GGGCTTTATCCATAAAATA - 3'

Mar2 5'- TTGGAAGAACCTTGATTA - 3'

Последовательности этих праймеров были описаны *M. Manzano* с соавт. (1997). Праймеры Mar 1 и Mar 2 комплиментарны участку гена *iap* *Listeria monocytogenes* в позициях 635 до 653 п.н. и от 1069 до 1085 пар нуклеотидов (п.н.). Они амплифицировали фрагмент ДНК с длиной 453 п.н.

Мишенью для этих праймеров L1 и L2 является ген *hly* A, продукт листериолизин, который играет важную роль в вирулентности *Listeria monocytogenes*:

L1 5' - GCATCTGCATTCAATAAAGA - 3'

L2 5' - TGTCACCTGCATCTCCGTGGT - 3'

Амплификацию проводили в амплификаторе «Терцик» (Россия).

Для приготовления аллергенов использовали бактериальную массу листерий, полученную на агаре Хоттингера с 0,4% глюкозой и аминным азотом 200 мг %. Методика получения отдельных аллергенов подробно представлена в разделе «Результаты исследований».

В опытах использовали 112 белых мышей линии *Bolebc*, 57 морских свинок и 42 кролика, 23 головы крупного рогатого скота.

В процессе работы проводилась статистическая обработка цифровых материалов на персональном компьютере *Dell*. В качестве рабочих программ использовались приложения пакета «*Microsoft*», «*Microsoft Word*» и «*Microsoft Excel*». При этом руководствовались методикой Р.Х. Тукшаитова [101].

## **3.2 Результаты исследований**

### **3.2.1 Изучение культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов листерий после длительного хранения**

Исследуемые штаммы освежали путем посева в мясопептонный бульон. Затем производили посевы на питательные среды (с гидролизатом лактоальбумина, бульон и агар Хоттингера).

Изучали морфологические свойства культур путем микроскопирования мазков, окрашенных по Граму. Ферментативную активность определяли на средах Гисса.

Вакцинный штамм листерий, хранившийся в лиофилизированном состоянии в течение 25 лет, сохранил жизнеспособность. Культуры листерий в полужидком агаре Китта-Тароцци под вазелиновым маслом, при хранении в температуре +2...4°C оказались жизнеспособными в течение 6-7 лет.

После пересева одно- и двухсуточные культуры листерий в мазках по Граму окрашивались положительно, имели форму полиморфных палочек с закругленными концами (рис.2).

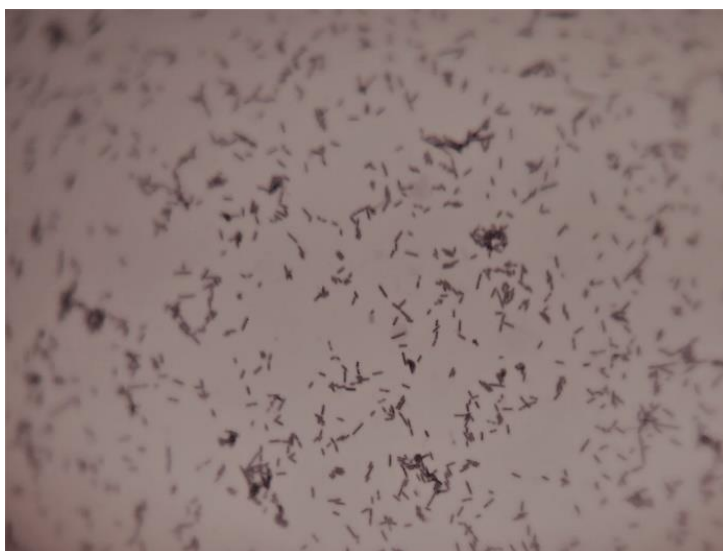


Рисунок 2 – *Listeria monocytogenes* под микроскопом (мазок из суточной культуры, окраска по Граму (кратность - 400х)

Спор и капсул не образовывали. При рассмотрении в висячей капле бактерии проявляли подвижность. Подвижность их подтверждалась и при культивировании в полужидком 0,2% МПА в U-образных пробирках.

На МПА через 20...40 часов инкубации при температуре 37°C появлялись мелкие прозрачные колонии. При культивировании в жидких

питательных средах помутнение наблюдалось через 12-18 часов инкубации при температуре 37°C. Результаты исследований свойств штаммов после освежения приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Культурально-морфологические и антигенные свойства штаммов листерий после длительного хранения

№ п/ п	Показатели	Наименование штаммов						
		АУФ	9-129	2797	9-127	9-128	9-130	T-71
1.	Окраска по Граму	+	+	+	+	+	+	+
2.	Подвижность	+	+	+	+	+	+	+
3.	Рост в МПБ	Помутнение, образование «косички»						
4.	Рост в МПА	Мелкие прозрачные колонии						
5.	Агглютинабельность полиспецифической листериозной сывороткой	+	+	+	+	+	+	+
6.	Агглютинабельность сывороткой 1-го серотипа	+	-	+	-	-	-	-
7.	Агглютинабельность сывороткой 2-го серотипа	-	+	-	+	+	+	+

Все изучаемые штаммы *Listeria monocytogenes* проявляли одинаковые культурально-морфологические свойства. Антигенные свойства данных штаммов соответствовали 1-му и 2-му серотипу при исследовании агглютинирующей сывороткой. Восстановленные культуры листерий обладали подвижностью при культивировании при 22°C в МПБ, что подтверждалось при инкубировании их в U-образных пробирках и микроскопией в «висячей капле». Результаты изучения сахаролитических свойств штаммов листерий приведены в таблице 6.

Таблица 6 - Ферментативная активность штаммов листерий

п/п	Наименование субстратов	Наименование штаммов						
		АУФ	9-129	2797	9-127	9-128	9-130	T-71
1.	Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
	Левулеза	+	+	+	+	+	+	+
	Сахароза	-	-	-	-	-	-	-
	Салицин	+	+	+	+	+	+	+
	Рамноза	+	+	+	+	+	+	+
	Дульцит	-	-	-	-	-	-	-
	Инулин	-	-	-	-	-	-	-
	Сорбит	-	-	-	-	-	-	-
2.	Каталазная активность	+	+	+	+	+	+	+
3.	Образование сероводорода в бульоне Хоттингера	+	+	+	+	+	+	+
4.	Гемолитическая активность	+/-	+	+	+	+	+	+

Ферментативная активность изучаемых штаммов *Listeria monocytogenes* свидетельствует о том, что бактерии ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, рамнозу, салицин, левулезу. Изменение pH среды происходит в первые двое суток. Листерии не изменяют среду с сахарозой, дульцитом, инулином, сорбитом. Все штаммы проявляли каталазную и гемолитическую активность. В бульоне Хоттингера, в процессе жизнедеятельности эти микроорганизмы выделяли сероводород.

Результаты проведенных исследований свидетельствует о длительном сохранении жизнеспособности и исходных культурально-морфологических и других свойства штаммов листерий при хранении в лиофилизированном состоянии под азотом, а также при хранении в полужидком агаре Китта-Тароцци под вазелиновым маслом при  $t=+2...4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2 Определение вирулентности штаммов листерий после хранения**

Для определения вирулентности изучаемых штаммов производили подкожное заражение белых мышей массой 16-18 г суспензиями *Listeria monocytogenes*.

Минимальная смертельная доза для свежих эпизоотических штаммов при подкожном способе заражения составила 1-2 млн. микробных клеток. Однако у культур после длительного хранения патогенность значительно снижалась, и минимальная смертельная доза варьировала в пределах 20...30 млн. микробных клеток. После 2-3 пассажей через организм белых мышей патогенность эпизоотических штаммов повышалась и составила 2-3 млн. микробных клеток. У животных наблюдались признаки вялости, отказа от

корма, судороги. Смерть мышей наступала в течение двух недель со дня заражения.

Белые мыши, инфицированные подкожно вакцинным штаммом листерий АУФ в дозе 1 млрд. микробных клеток, не погибали.

Однако вирулентность культур после освежения, оказалось значительно ниже исходных показателей (1-2 млн. микробных клеток). Вирулентность этих культур восстанавливалась после двух и трех пассажей через организм белых мышей.

Таблица 7 – Вирулентность штаммов листерий

Наименование Штаммов	Минимальная смертельная доза	
	после хранения, млн. м.к	после трех пассажей через организм белых мышей, млн. м.к
АУФ	3000,0	3000,0
9-127	20,0	1,0
9-128	20,0	1,0
9-129	30,0	2,0
9-130	20,0	1,0
9-72	30,0	2,0
2797	20,0	1,0

После заражения вакцинным штаммом *Listeria monocytogenes* АУФ в дозе 3,5 млрд. м.к. белых мышей, часть животных погибали. Поссажирование этого штамма через организм мышей не приводило к повышению вирулентности. Эпизоотические и референтные штаммы (9-127, 9-128, 9-129, 9-130, 9-72, 2797) проявляли высокую вирулентность,

только после трех пассажей через организм восприимчивых животных. Максимальная летальная доза составляет 1-2 млн.

Для характеристики вирулентности дополнительно ставили конъюнктивальную пробу на морских свинках. Для постановки данного опыта было взято 6 животных, что соответствовало количеству имеющихся исследуемых штаммов. Каждой морской свинке в область под верхнее веко одного глаза с помощью глазной пипетки была введена бактериальная суспензия, ранее приготовленная из культур штаммов. Во второй глаз, который являлся контрольным, вводили одну каплю воды. Реакцию учитывали через 30 минут и 24 часа после введения. При осмотре через 30 минут после нанесения культуры листерий на конъюнктиву видимых изменений не наблюдалось. Через 24 часа у всех животных наблюдалась положительная реакция, а именно, покраснение всей конъюнктивы и склеры глаза, в которую была введена микробная суспензия. Во втором глазу (контрольном) изменений не наблюдалось.

Полученные данные свидетельствуют о сохранении после длительного хранения вирулентных свойств штаммов листерий.

### **3.2.3 Ультразвуковая и химическая дезинтеграция листерий**

Для разрушения бактериальных клеток суспензию листерий с концентрацией 20 млрд. микробных клеток в 1 мл подвергали воздействию ультразвука в ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т с излучателем 35 кГц, при силе тока 0,3 А и подмагничивании 5. Объем бактериальной суспензии составляли 10 см<sup>3</sup>. Озвучивание проводили при поверхностном погружении излучателя. Для предотвращения нагревания в кожух стакана подавали водопроводную воду с температурой 20 °С. В данном режиме

бактериальную клеточную суспензию озвучивали в течение 20, 40, 60 и 80 минут. Степень разрушения микробных клеток контролировали микроскопией мазков, окрашенных по Граму и по оптической плотности на фотоколориметре КФК 1-2 М. В последующем неразрушенные микробные клетки удаляли центрифугированием при 4000 об/мин 20 минут. Надосадочную жидкость использовали для электрофореза. Обобщенные результаты влияния ультразвука на суспензию листерий приведены в таблице 8 и рисунке 2.

При озвучивании суспензии листерий ультразвуком от 20 до 40 мин, оптическая плотность суспензии практически не изменялась, а при микроскопировании мазков, окрашенных по Граму, наблюдались лишь единичные разрушенные клетки. При электрофорезе надосадочной жидкости после ультразвуковой дезинтеграции в электрофореграммах выявлялись единичные фракции полипептиды, что свидетельствует об отсутствии лизиса бактериальных клеток.

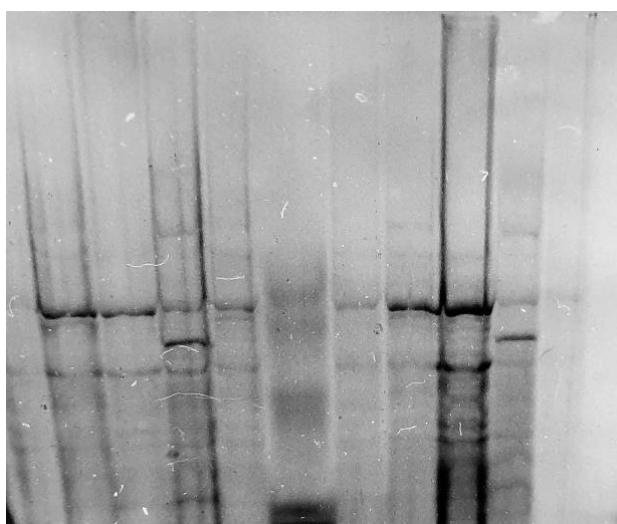
Таблица 8 – Влияние ультразвука на оптическую плотность суспензии листерий и их выживаемость

Продолжительность озвучивания	Показатели оптической плотности суспензии	КОЕ/ мл в разв. $10^{-7}$
Исходная (0)	$2,0 \pm 0,02$	$1989,0 \pm 18,0$
20 мин	$1,9 \pm 0,03$	$1973,0 \pm 13,0$
40 мин	$1,9 \pm 0,03$	$1970,0 \pm 14,0$
60 мин	$1,8 \pm 0,04$	$1960,0 \pm 17,0$
80 мин	$1,8 \pm 0,06$	$1890,0 \pm 12,0$

Как видно из полученных данных оптическая плотность суспензии листерий при озвучивании в течение 20 мин снизилась лишь на 5%. При

облучении в течении 40...60 мин оптическая плотность суспензии снизилась только на 10%. В исходной суспензии количество колониеобразующих единиц в 1 мл составляло  $1989,0 \pm 18,0$ . После озвучивания в течение 20...40 мин оно снизилось незначительно. При облучении в течении 80 мин количество жизнеспособных клеток составило 95% от исходного уровня.

В дальнейшем при электрофоретической разгонке надосадочной жидкости, после УЗ – озвучивания, проявлялись лишь единичные фракции полипептидов (рис. 3).



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Рисунок 3 – Электрофореграмма исследуемых суспензий штаммов  
листерий в ПААГе после УЗ – озвучивания

1-2 – суспензия штаммов АУФ и 2797 после УЗ – озвучивания в  
течение 20 мин

3-4 – те же суспензии после озвучивания в течение 40 мин

5 – суспензия штамма 2797 после озвучивания в течение 50 мин

6-7 – суспензии штаммов АУФ и 2797 после озвучивания в течение 60 мин

8-9 – суспензии штаммов АУФ и 2797 после 80 мин озвучивания

Анализируя полученные электрофореграммы озвученных УЗ суспензий листерий, можно констатировать, что лизиса клеток практически нет. На электрофореграммах выявлялись единичные фракции полипептидов. Только на электрофореграмме листерий штамма АУФ после 80 мин озвучивания появилось больше фракций полипептидов по сравнению с остальными. О недостатках ультразвукового разрушения бактерий отмечают и другие исследователи [104,194].

Бактериальные клетки так же, как и другие, состоят из различных макромолекул. Результат экспрессии генов является главным инструментом, при помощи которого геном управляет всеми метаболическими реакциями клетки. Белки участвуют в построении клеток и тканей, выполняют антигенные, каталитические, сократительные, защитные, транспортные, рецепторные и другие функции. Поэтому изучение белкового спектра бактериальных клеток представляет значительный теоретический и практический интерес.

Белки возбудителя листериоза недостаточно изучены. Имеются сообщения о сравнительном изучении аминокислотного состава различных штаммов листерий [2]. При этом различий в качественном и количественном аминокислотном составе разных штаммов листерий не выявлено.

Следующим этапом наших исследований явилось выделение и определение электрофоретических профилей полипептидов разных штаммов листерий.

Учитывая то, что грамположительные и грамотрицательные бактерии имеют разную устойчивость и лизирующим фактором, необходимо было подобрать детергентную смесь для разрушения клеток листерий [72].

В связи с тем, что грамположительные бактерии, к которым относится *Listeria monocytogenes*, чувствительны к лизису под действием ДДС-Na, нами была использована детергентная смесь, состоящая из ДДС-Na и меркаптоэтанола в трис-буфере. Данная смесь обеспечивала эффективный лизис клеток листерий до отдельных фракций полипептидов.

После лизиса клеток, разделение полипептидов листерий проводили путем электрофореза по *Laemmli* [156] в полиакриламидном геле с 0,1 % додецилсульфатом натрия с линейным градиентом 7-16% акриламида. На каждую лунку наносили лизаты с содержанием 100 мкг белка, определенного по методу Лоури [155]. Электрофореграммы фиксировали 50% этанолом и окрашивали раствором Кумасси R-250. В качестве маркерных белков использовали бычий сывороточный альбумин (М.м. = 69 кДа), цитохром С (М.м. = 12 кДа), фосфоорилазу (М.м. = 97,4 кДа).

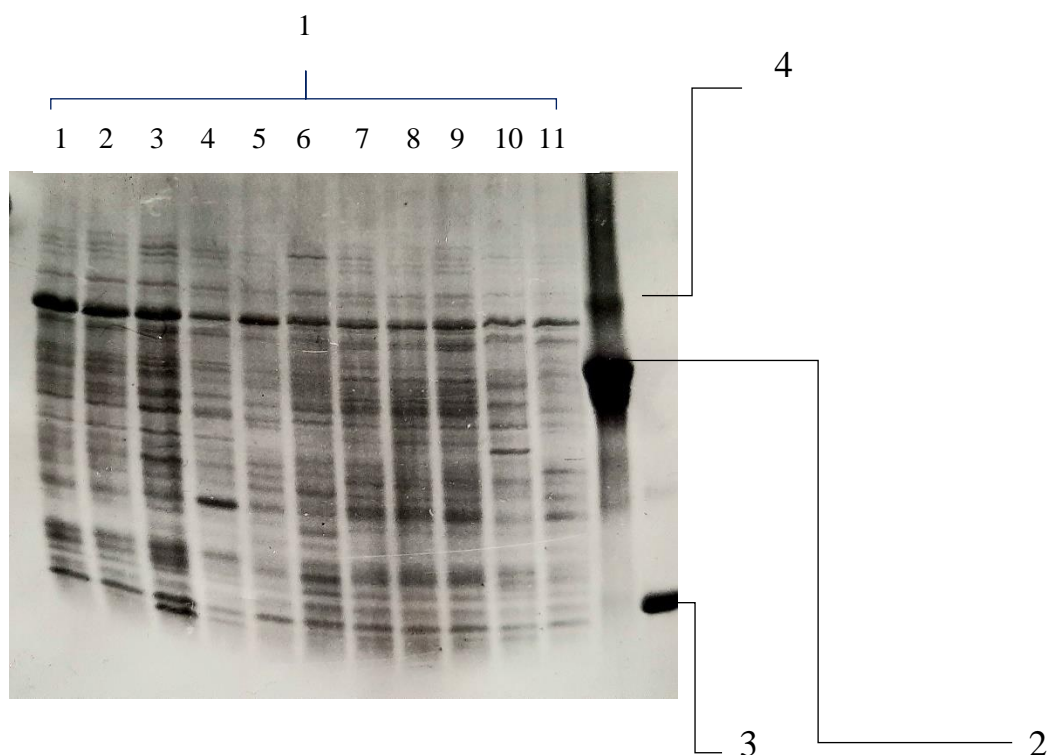


Рисунок 4 – Электрофореграмма полипептидов суспензии листерий, полученных воздействием детергентной смесью.

1 – Лизаты клеток бактерий (1,2,11 – штамм АУФ, 3 – 9-127, 4 – 9-128, 5 -9-129, 6 – 9-130, 7 – Т-71, 10 – 2797)

2 – Бычий сывороточный альбумин, М.м. – 69 кДа

3 – Цитохром С М.м. – 12 кДа

4 – Фосфоорилаза М.м. – 97,4 кДа

В составе лизатов листерий различных штаммов выявлялись до 52 фракций полипептидов с молекулярной массой от 10 до 73 кДа. В качественном составе белков фракций среди разных штаммов существенных различий не выявлено. У всех штаммов выявлялась одна мажорная фракция полипептида с молекулярной массой 51-52 кДа. Кроме того, у вакцинного штамма листерий АУФ в отличие от вирулентных проявлялась более мажорная фракция с молекулярной массой около 18 кДа, хотя она присутствовала у всех исследуемых штаммов, но менее интенсивно.

Таким образом, проведенные исследования показали, что клетки листерий проявляли высокую устойчивость при воздействии ультразвука, и практически не разрушались при озвучивании в течение 60-80 мин при интенсивности 35 кГц и силе тока 0,3 А.

Обработка бактериальных клеток детергентной смесью, способствовало полному лизису и расщеплению клеточных структур с освобождением полипептидов с широким спектром молекулярных масс.

Количество фракций полипептидов у исследуемых штаммов листерий было сходным. Однако, выявлялись некоторые штаммовые особенности по количественному показателю отдельных фракций полипептидов. Однородность полипептидного состава разных штаммов *Listeria monocytogenes* независимо от вирулентности и серотиповых особенностей свидетельствует о близком их геномном родстве.

### **3.2.4 Выделение аллергенов и изучение их свойств**

#### **3.2.4.1 Выделение аллергенов и изучение их свойств**

Для получения бактериальных аллергенов применяются различные способы физико-химической обработки [45,50,84]. Мы использовали обработку клеток листерий растворами серной кислоты, уксусной кислоты, едкого натрия и ДДС-Na [86,106]

#### **Получение аллергенов листерий уксусной кислотой**

При экстрагировании сухой биомассы листерий 0,1 н раствором уксусной кислоты путем автоклавирования 1,5 атм. в течение 30 минут, выхода белковых компонентов не наблюдалось, т.к. не отмечалось выпадения осадка при добавлении трихлоруксусной кислоты в концентрации от 5 до 20%. Осадок не выпадал и после нейтрализации кислотного гидролизата раствором едкого натрия и при последующем насыщении сернокислым аммонием. Следовательно, при экстрагировании 0,1 н уксусной кислотой не удастся выделить белковые субстанции из клеток листерий.

#### **Получение аллергенов обработкой клеток листерий 0,2 н раствором серной кислоты**

Для получения аллергенных фракций листерий вакцинного штамма АУФ обработали серной кислотой (рис.5).

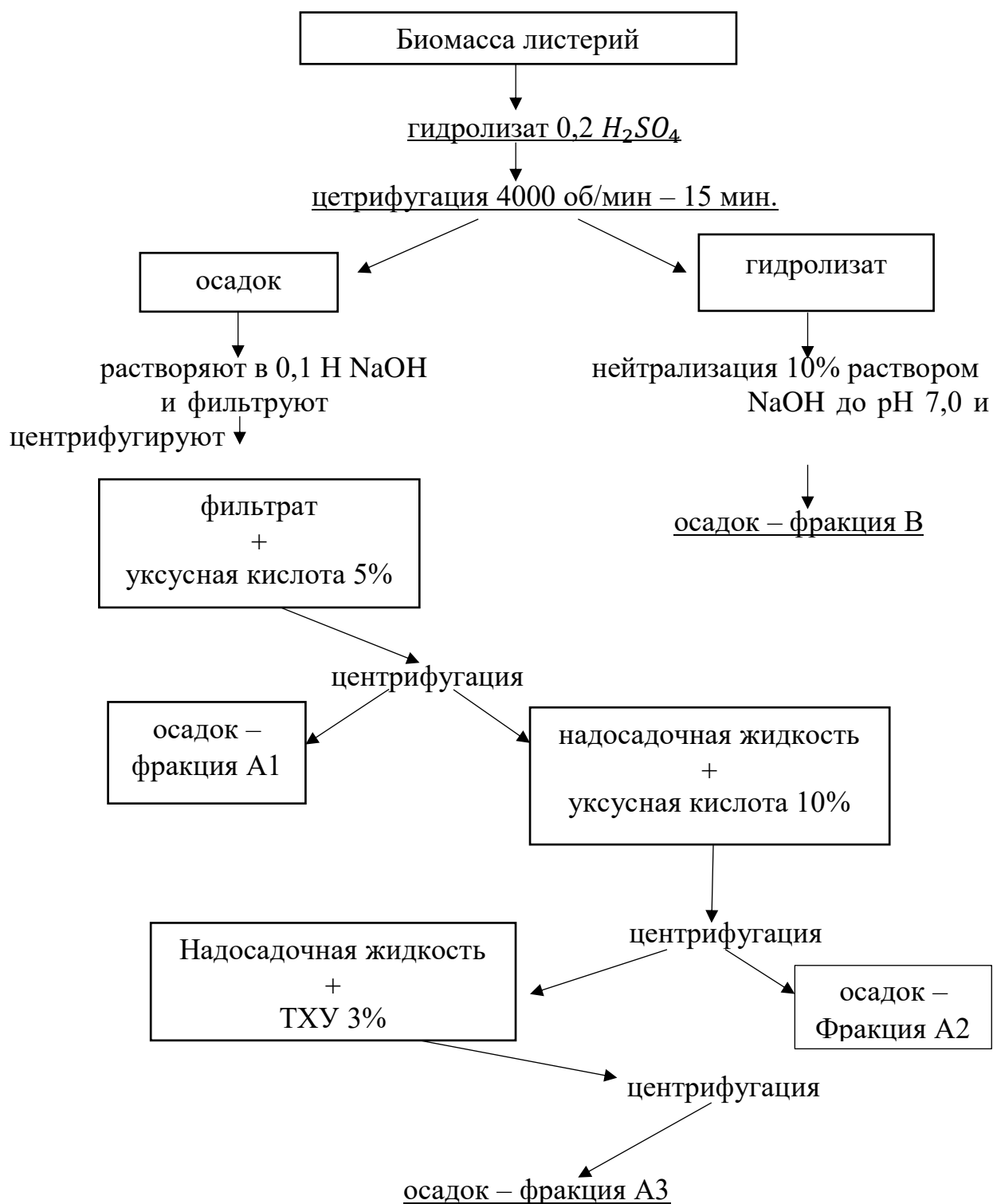


Рисунок 5 – Схема выделения аллергенов гидролизом серной кислоты

Для этого 50 мг сухой бактериальной массы суспензировали в 10 мл 0,2 н растворе серной кислоты, выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем автоклавировали при 1,5 атм. в течение 30 минут. После автоклавирования суспензию центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Осадок растворяли в 0,1 N растворе едкого натрия и раствор фильтровали через базальный фильтр. К полученному фильтрату добавляли 5% уксусную кислоту и оставляли в холодильнике на ночь. Утром осадок отделяли центрифугированием при 5000 об/мин – 10 минут. Осадок лиофилизировали и обозначали – Фракция А1. Надосадочную жидкость использовали для выделения следующих фракций.

После удаления Фракции-А1 получали Фракцию А2. Для этого центрифугат нейтрализовали до рН 7,0 10 % раствором уксусной кислоты и выдерживали при 4°C - 12 часов и осадок отделяли центрифугацией (5000 об/мин – 15 мин).

Фракция А3 – выпадала в осадок после удаления Фракции – А2 и последующего добавления 20% раствора ТХУ до конечной концентрации 3%.

Фракция В - выпадала в осадок при нейтрализации в гидролизата до рН 7,0 10 % раствором *NaOH* и выдержке его в течение 12 часов в холодильнике при температуре 4°C. Осадок отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 минут. Промывали 96% спиртом и эфиром. Высушивали в вакуум – сушильном шкафу при температуре 36°C.

### **Получение аллергенов по методу Цуверкалова в описании Шапиро и Денисова [106]**

Получение аллергена по данному методу производили по следующей схеме (рис.6)

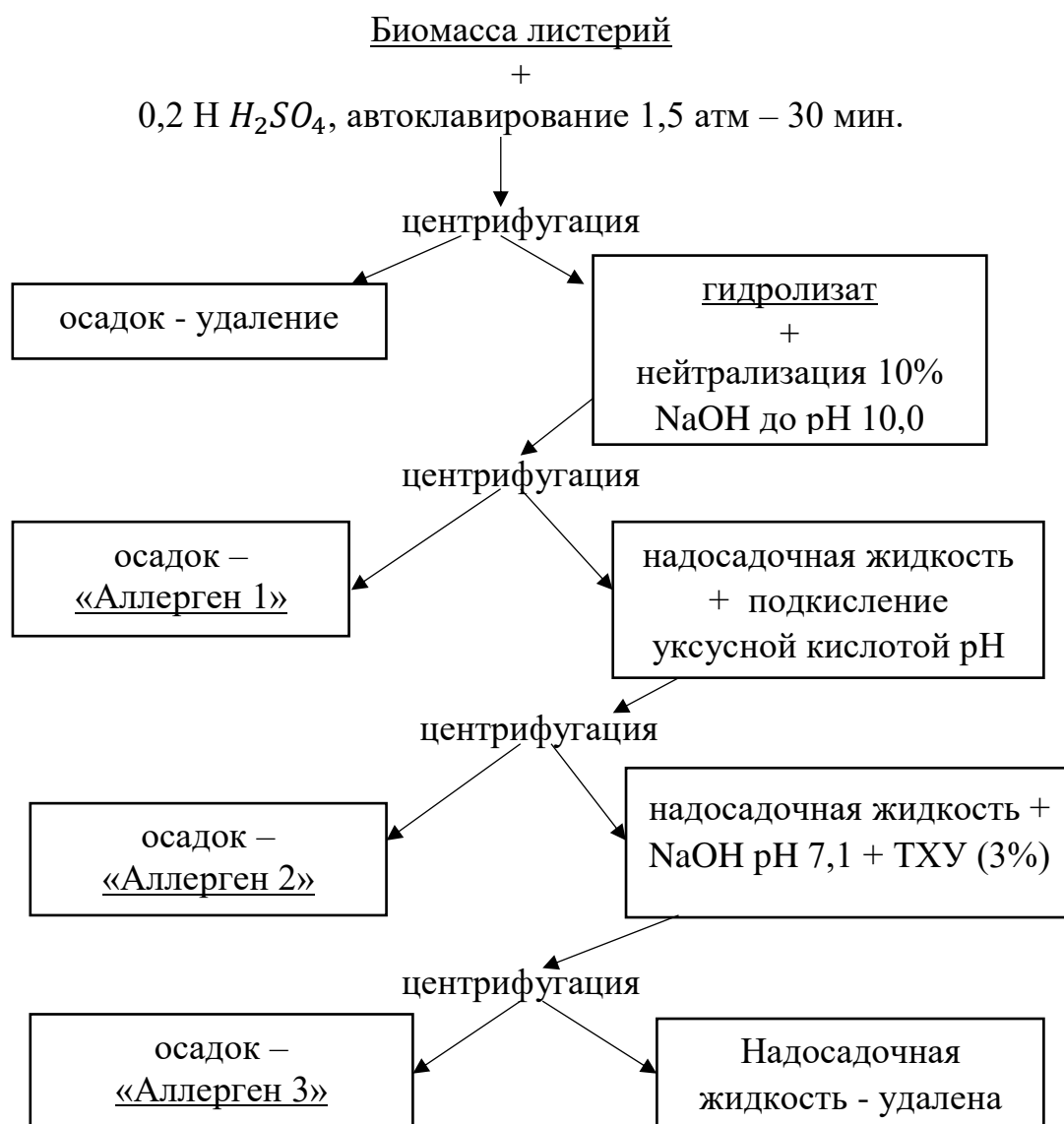


Рисунок 6 - Схема фракционирования аллергена

Для этого 2 г сухой биомассы листерий разводили в 400 мл 0,2 н раствор серной кислоты и подвергали автоклавированию при 1,5 атм. в течение 30 минут. Затем остужали до комнатной температуры и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут. Неразрушенные и полуразрушенные клетки (осадок) - удаляли. К надосадочной жидкости добавляли 10% раствор  $NaOH$  и доводили до pH 10,3. Оставляли на ночь в холодильнике. Утром осадок отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут. Полученный осадок лиофилизировали и

обозначили как «Аллерген 1». После удаления комплекса «Аллерген 1» – рН надосадочной жидкости довели до 4,0 – при этом происходило помутнение жидкости. Эту жидкость подвергали центрифугированию при 5000 об/мин в течение 20 минут. Полученный осадок обозначили как Аллерген 2.

После отделения Аллергена 2 надосадочную жидкость нейтрализовали раствором едкого натрия до рН 7,1 и при последующем добавлении 20% раствора ТХУ до конечной концентрации 3% осаждался комплекс - Аллерген 3.

Показатели количественного выхода отдельных фракций представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Выход разных фракций – аллергенов листерий

Название Фракций	Выход фракций в %
Фракция А1	31,0
Фракция А2	1,0
Фракция А3	1,21
Фракция В	2
Аллерген 1 (Препарат №4)	1,3
Аллерген 2 (Препарат №5)	0,6
Аллерген 3 (Препарат №6)	4,4

Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольший выход имеет фракция аллерген 1. Количественный выход остальных фракций аллергенов варьировал от 0,6 до 4,4%.

## Фракционирование антигенов листерий детергентом -ДДС-Na

Получение антигенов листерий детергентом ДДС-Na проводили по следующей схеме (рис.7).

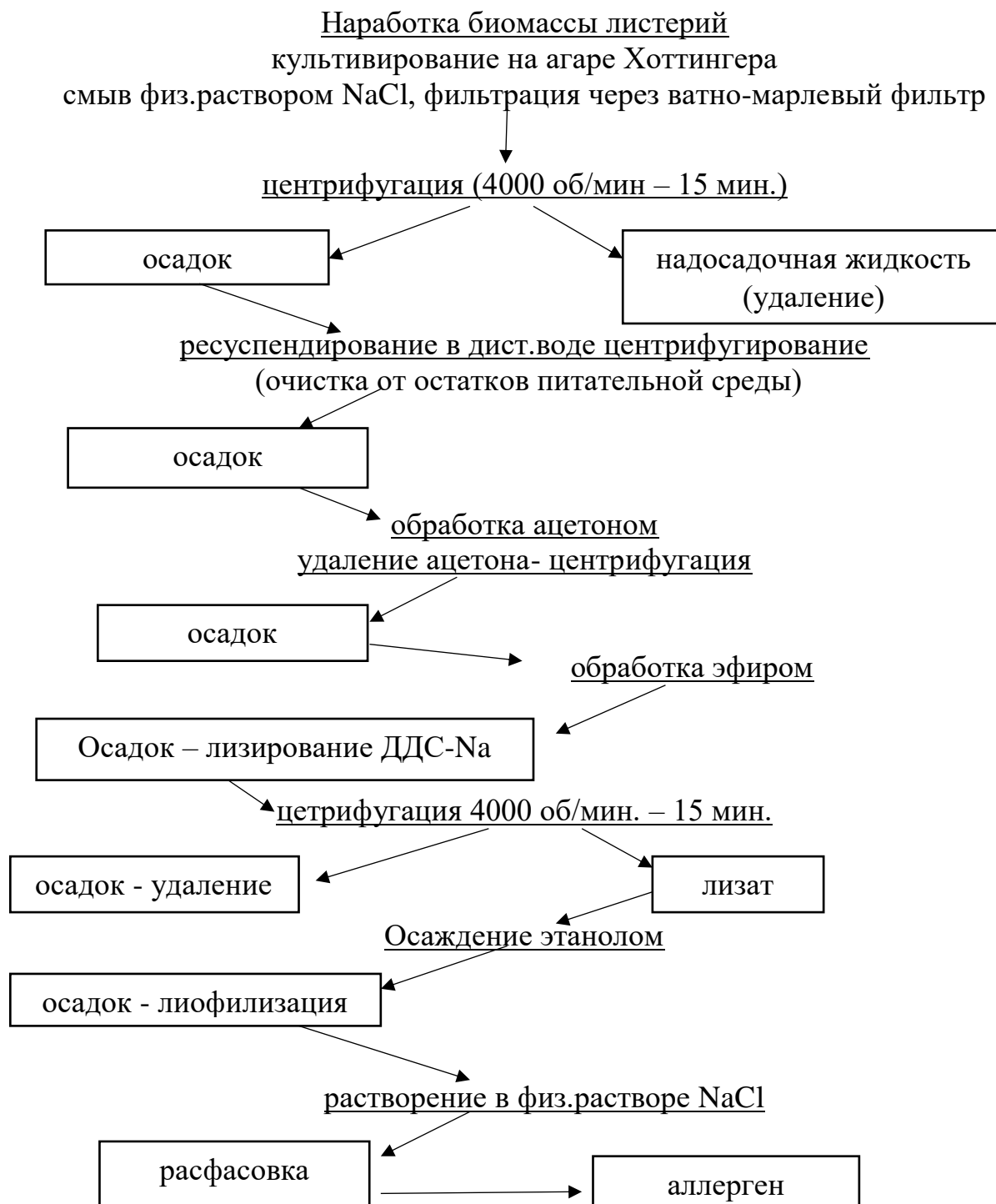


Рисунок 7 – Схема получения листериозного аллергена с ДДС-Na

Для этого использовали бактериальную массу штамма Т-71, полученную на агаре Хоттингера с 2% глицерином и 0,4% глюкозы. Двухсуточную агаровую культуру листерий, выращенную при 37°C, смывали стерильным физиологическим раствором.

Затем, смыв с агара, фильтровали через ватно-марлевый фильтр. После этого микробную массу отделяли от жидкой среды путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 15 мин. Осадок суспензировали в дистиллированной воде и вновь центрифугировали.

К осадку добавили ацетон (холодный, температура -20°C) и тщательно перемешивали. Дали отстояться 15 - 20 минут и центрифугированием отделяли микробную массу. Осадок с помощью эфира (холодного) перенесли на чашку Петри и высушили на воздухе (получали ацетоновый порошок).

Для получения аллергена 200 мг ацетонового порошка листерий растирали в ступке пестиком до порошкообразного состояния и залили 10 мл дистиллированной воды. Перемешав, добавили 100 мг ДДС-Na (до 0,1%), 2-3 капли толуола и оставили на ночь в холодильнике при температуре +4°C (18...24 часа). Утром центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 минут. Осадок – нерасщепленные и нерастворенные клетки удаляли. К надосадочной жидкости добавили 2 объема этилового спирта и оставили при +4°C в холодильнике на 15 часов.

Затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15-20 минут. Осадок растворяли (суспензировали) в 5 мл воды и диализировали в течение 10-12 часов против дистиллированной воды. Затем высушивали в вакуум-сушильном шкафу. Выход экстракта полученный с ДДС-Na составлял 15%.

Полученные фракции препаратов подвергали лиофилизации в вакуум-сушильном шкафу. Затем для изучения аллергенных свойств их растворяли в физиологическом растворе из расчета 100 мкг в 1 мл,

содержащем Тритон Х-100 в соотношении 1:20000 (для предотвращения денатурации аллергенов) и их адсорбции на стекле.

### **Получение корпускулярного аллергена**

Корпускулярный аллерген готовили из суспензии листерий штамма Т-71, полученной из агаровой культуры. Смыв агаровой культуры разводили физиологическим раствором натрия хлорида до концентрации 2 млрд в 1 мл. Затем автоклавировали при 1 атмосфере 30 мин.

Стерильность полученных препаратов определяли путем посева на питательные среды (МПА, МПБ), которые наблюдали в течение 7 суток.

Полученные препараты использовали для изучения аллергенной активности на сенсibilизированных морских свинках и кроликах.

#### **3.2.4.2 Определение электрофоретических профилей полученных препаратов**

Состав потенциальных аллергенов имеет определяющее значение в их активности. Поэтому мы определяли электрофоретические профили полученных препаратов методом электрофореза в ПААГе с градиентом 7-16% акриламида. Результаты одного из анализов приведены на рис.8.

В составе аллергена полученным с ДДС-На выявляется только одна мажорная фракция полипептида с М.м. – 12,0 кДа, что важно для аллергена. В препаратах, полученных разными способами обработки микробной массы листерий, присутствует широкий спектр полипептидов от 10 до 40 фракций с М.м. от 100,0 и до 10,0 кДа и менее.

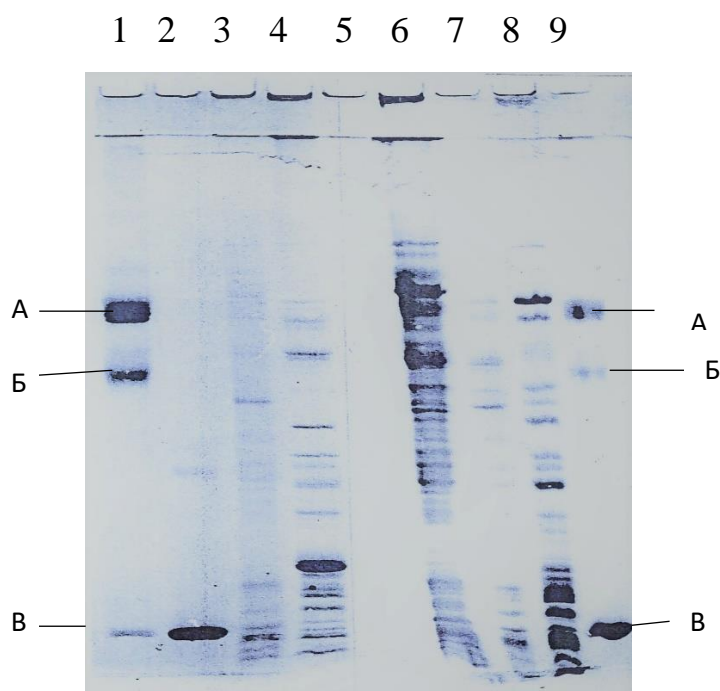


Рисунок 8 – Электрофоретические профили полученных препаратов.

1,9 – белки маркеры:

А) фосфоорилаза (М.м. – 97,4 кДа).

Б) бычий сывороточный альбумин (М.м. – 69,0 кДа)

В) цитохром ( М.м. – 12,0 кДа)

2 – аллерген ДДС-Na

3 – фракция А1

4 – фракция В

5 – аллерген 3

6 – аллерген 2

7 – аллерген А3

8 – аллерген 1

Наличие в препаратах широкого спектра полипептидов является негативным фактором, так как они, обладая разными свойствами, могут вызывать искажение результатов аллергической реакции. Присутствие высокомолекулярных компонентов может вызывать сенсibilизацию организма и выработку антител.

Поэтому препарат, полученный ДДС-Na, с молекулярной массой 12 кДа является по составу наиболее пригодным для использования в качестве специфического аллергена.

### **3.2.5 Изучение аллергических свойств и безвредности полученных препаратов (аллергенов)**

Все полученные аллергены растворяли в физиологическом растворе хлористого натрия из расчета 100-200 мкг на 1 мл, затем стерилизовали автоклавированием и расфасовывали в ампулы по 2 мл. Все приготовленные препараты проверяли на безвредность. Для этого каждый препарат (аллерген) вводили подкожно 3 мышам в объеме 0,5 мл. За животными наблюдали в течении 10 суток. Отклонений в их клиническом статусе не наблюдалось.

Первую серию опытов проводили для сравнительного определения активности полученных препаратов – аллергенов. Для этого использовали интактных и сенсibilизированных морских свинок и кроликов. Для сенсibilизации проводили вакцинацию морских свинок культурой штамма листерий АУФ 1 млрд м.к. внутримышечно. Через 1 месяц после вакцинации ставили внутрикожную аллергическую пробу с испытуемыми аллергенами. Для этого у каждого животного было подготовлено место для введения препарата: выстригалась область спины, и перед введением аллергена она обрабатывалась 70% этиловым спиртом. Аллерген вводили строго внутрикожно инсулиновыми шприцами в объеме 0,1 мл с обеих сторон. Результаты аллергической пробы оценивали через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часов.

Внутрикожную аллергическую реакцию оценивали измерением толщины кожной складки кутиметром, а также по выраженности местной воспалительной реакции в виде гиперемии и отека.

Сразу после введения аллергена и физиологического раствора появлялась небольшая припухлость (1– 1,5 мм) в виде «лимонной корочки», которая через 2-3 часа плотностью исчезала. У сенсibilизированных животных через 16-18 часов на месте введения препарата появлялись покраснение и болезненная припухлость, которые становились наиболее заметны через 24-48 часов. По истечении 48 и более часов воспалительный процесс постепенно угасал. После внутрикожного введения аллергена интактным (нормальным) морским свинкам местная реакция в виде небольшой припухлости исчезала через 3-6 часов так же, как и при введении физиологического раствора хлористого натрия. У сенсibilизированных животных местная реакция проявлялась, начиная с 16 часов, и достигала максимального уровня на 24-48 часам. Она проявлялась в виде покраснения, припухлости и болезненности. Размер припухлости варьировал в зависимости от испытуемого препарата, и её диаметр составлял 10-20 мм. При положительной реакции толщина кожной складки увеличивалась в 1,5 – 2 и более раза. Результаты приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Местная реакция на аллергены у морских свинок, через 1 месяц после сенсibilизации вакцинацией (n=3).

№ п/п	Наименование фракций препарата	Толщина кожной складки, мм			
		в норме	Через 24ч	Через 48ч	Через 72ч
1	2	3	4	5	6
1.	Фракция А1	1,5±0,3	2,2±0,3	3,1±0,3	1,8±0,3
2.	Фракция А2	1,5±0,3	1,9±0,3	2,7±0,3	1,5±0,3

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5	6
3.	Фракция А3	1,5±0,3	2,1±0,3	2,9±0,3	1,6±0,3
4.	Фракция В	1,6±0,3	1,7±0,3	2,4±0,3	1,6±0,3
5.	Аллерген 1	1,6±0,3	1,8±0,3	2,5±0,3	1,6±0,3
6.	Аллерген 2	1,5±0,3	2,2±0,3	3,1±0,3	1,8±0,3
7.	Аллерген 3	1,5±0,3	1,9±0,3	2,7±0,3	1,5±0,3
8.	Корпускулярный аллерген	1,6±0,3	3,2±0,3	3,5±0,3	3,7±0,3 (некроз)
9.	Аллерген полученный ДДС-Na	1,4±0,3	2,7±0,3	2,9±0,3	1,8±0,2

Анализируя активность полученных препаратов, следует отметить, что все они обладают выраженной аллергенной активностью, т.е. вызывали положительную реакцию по типу гиперчувствительности замедленного типа у сенсibilизированных (вакцинированных) морских свинок. Наиболее интенсивная реакция была у корпускулярного препарата, которая переходила в местный некротический процесс. Выраженной аллергенной активностью обладали препараты А1, А3 и аллергены 2 и 3. Через 24 часа после введения аллергена 9 (полученного с ДДС-Na) толщина кожной складки увеличивалась более 2 раз и к 48 часам достигала  $2,9 \pm 0,3$  мм. Затем к 72 часам местная реакция угасала. Явлений некроза не наблюдалось.

Следующая серия опытов была проведена на кроликах. Испытания полученных препаратов на вакцинированных кроликах показали сходные результаты, полученные на морских свинках (таблица 11).

Таблица 11 – Местная реакция на введение аллергена кроликам, вакцинированных штаммом АУФ (n=3)

№ п/п	Наименование фракций препарата	Толщина кожной складки, мм			
		в норме	Через 24ч	Через 48ч	Через 72ч
1.	Фракция А1	1,5±0,3	2,5±0,3	3,3±0,3	2,0±0,3
2.	Фракция А2	1,4±0,3	2,3±0,3	2,9±0,3	1,8±0,3
3.	Фракция А3	1,3±0,3	2,3±0,3	3,0±0,3	1,9±0,3
4.	Фракция В	1,4±0,3	2,0±0,3	2,6±0,3	1,6±0,3
5.	Аллерген 1	1,5±0,3	2,1±0,3	2,7±0,3	1,7±0,3
6.	Аллерген 2	1,3±0,3	2,5±0,3	3,3±0,3	2,0±0,3
7.	Аллерген 3	1,5±0,3	2,2±0,3	2,9±0,3	1,8±0,3
8.	Корпускулярный аллерген	1,5±0,3	2,5±0,3	3,8±0,3	3,9±0,3 (некроз)
9.	Аллерген, полученный ДДС-Na	1,3±0,3	2,7±0,3	3,3±0,3	2,0±0,3

Дермoneкротический эффект корпускулярного аллергена проявлялся и на кроликах. На внутрикожное введение всех испытуемых препаратов у вакцинированных кроликов проявлялось аллергическая реакция замедленного типа, которая достигала максимума к 36- 48 часам и затем постепенно угасала. Наиболее выраженная аллергическая реакция наблюдалась с аллергеном 9 (ДДС-Na).

При постановке аллергической внутрикожной пробы через 2 и 3 месяца после сенсibilизации морских свинок реакция так же была

положительная, которая проявлялась в виде гиперчувствительности замедленного типа, т.е. местная воспалительная реакция на аллерген развивалась через 18 - 20 и более часов и достигала максимума к 24-48 часам и затем угасала.

При постановке внутрикожной аллергической пробы через 2 месяца после вакцинации у всех 5 морских свинок проявлялась положительная реакция на листериозные аллергены. У морских свинок интенсивность аллергической реакции угасала через 3 месяца после вакцинации. Положительная реакция регистрировалась у 60% животных и ее проявление было менее выраженной, и толщина кожной складки увеличивалось не более 1,3 - 1,5 раза. Аналогичная тенденция отмечалась и у кроликов.

Вторая серия опытов была проведена на морских свинках и кроликах, сенсибилизированных сублетальными дозами вирулентного штамма листерий 2797.

Для этого морским свинкам с массой 380-420 г подкожно вводили суспензию агаровой культуры листерий в дозе 1 млн м.к. Через 1 месяц после сенсибилизации интактным и сенсибилизированным морским свинкам внутрикожно вводили испытуемые препараты. Результаты аллергической пробы обобщены в таблице 12.

Таблица 12 – Аллергенная активность препаратов у морских свинок, инфицированных патогенным штаммом листерий 2797 (n=3)

№ п/п	Наименование фракций препарата	Толщина кожной складки, мм			
		в норме	Через 24ч	Через 48ч	Через 72ч
1	2	3	4	5	6
1.	Фракция А1	1,6±0,3	2,3±0,3	3,0±0,2	1,8±0,3
2.	Фракция А2	1,6±0,3	2,2±0,3	2,6±0,3	1,6±0,3

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6
3.	Фракция А3	1,5±0,3	2,2±0,3	2,8±0,3	1,7±0,3
4.	Фракция В	1,4±0,3	1,8±0,3	2,5±0,3	1,4±0,3
5.	Аллерген 1	1,6±0,3	2,1±0,3	2,6±0,3	1,6±0,3
6.	Аллерген 2	1,5±0,3	2,2±0,3	3,0±0,2	1,8±0,3
7.	Аллерген 3	1,5±0,3	2,0±0,2	2,7±0,3	1,6±0,3
8.	Корпускулярный аллерген	1,6±0,3	3,2±0,3	3,6±0,3	3,9±0,3 (некроз)
9.	Аллерген, полученный ДДС-Na	1,5±0,3	2,6±0,3	3,3±0,3	2,0±0,2

У зараженных морских свинок, также как и у вакцинированных, происходила аллергическая перестройка организма по типу гиперчувствительности замедленного типа, которая выявлялась кожной пробой с препаратами, фракционированными из клеток листерий. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все испытуемые препараты обладают аллергенной активностью. Более выраженную аллергическую реакцию проявляли Фракция А1, аллерген 2 и аллерген, полученный ДДС-Na, а также корпускулярный аллерген. Однако последний проявлял некротический эффект не только у сенсibilизированных морских свинок, но и у интактных. Поэтому корпускулярный препарат оказался непригодным в качестве аллергена.

Полученные данные свидетельствуют о том, что приготовленные препараты обладают аллергенной активностью, которая проявлялась по типу гиперчувствительности замедленного типа. Положительная

воспалительная реакция характеризовалась гиперемией, отеком и покраснением на месте инъекции аллергена. Диаметр припухлости составлял 10-15 мм, утолщение кожи в 1,3-1,6 раза через 24-48 часов. Наиболее выраженная реакция была на корпускулярный препарат (толщина кожной складки в 2-2,4 раза). Однако при этом местная воспалительная реакция не угасала даже через 72 часа и приобретала некротический характер.

Среди испытуемых препаратов выраженной активностью обладал аллерген, полученный ДДС-На. После инъекции этого препарата у сенсibilизированных морских свинок положительная местная реакция появлялась через 24 часа, достигала максимума к 48 часам (утолщение кожной складки в 2,2 раза, диаметр припухлости 18 - 20 мм). Затем местная воспалительная реакция угасала, и к 72 часам диаметр припухлости составлял только 5-6 мм, толщина кожной складки превышала исходный показатель лишь в 1,3 раза.

В следующей серии опытов по дальнейшему изучению отобранных аллергенов кроликов сенсibilизировали (заражали) агаровой культурой штамма листерий Т-71 путем внутримышечной инъекции в дозе 100 млн. м.к. Через 2 месяца после заражения ставили внутрикожную аллергическую пробу с испытуемыми препаратами. Результаты исследований приведены в таблице 13.

У кроликов, инфицированных листериями, происходила аллергическая перестройка по типу ГЧЗТ, которая выявлялась кожной пробой с препаратами, полученными фракционированием микробных клеток.

Таблица 13 – Аллергенная активность препаратов на кроликах, инфицированных штаммом листерий Т-71 (n=3)

№ п/п	Наименование фракций препарата	Толщина кожной складки, мм			
		в норме	Через 24ч	Через 48ч	Через 72ч
1.	Фракция А1	1,0±0,1	1,9±0,2	2,1±0,2	1,3±0,2
2.	Фракция А3	1,2±0,2	1,8±0,1	1,9±0,2	1,2±0,2
3.	Аллерген 3	1,1±0,2	2,0±0,2	2,1±0,2	1,3±0,2
4.	Аллерген, полученный ДДС-Na	1,2±0,2	2,4±0,2	3,6±0,2	1,5±0,2

Положительная аллергическая реакция выражалась местным воспалительным процессом в виде болезненной припухлости, покраснения, гиперемии и утолщения кожной складки через 24 часа после внутрикожной инъекции аллергена. Выраженная местная реакция сохранялась в течение 48 часов и почти полностью угасала через 72 часа.

Среди испытываемых препаратов наиболее высокой активностью обладал аллерген, полученный экстракцией ДДС-Na. Поэтому этот препарат был подвергнут более подробному изучению в качестве аллергена для ретроспективной диагностики листериоза.

### **3.2.6 Изучение листериозного аллергена, полученного экстракцией додецилсульфатом натрия**

#### **3.2.6.1 Изучение безвредности и активности аллергена на лабораторных животных**

Аллергены не должны вызывать сенсibilизацию организма и не вызывать синтез специфических антител и обладать высокой чувствительностью и специфичностью [20,90]. С учетом этого и результатов предварительных исследований дальнейшим исследованиям подвергали аллерген, выделенный додецилсульфатом натрия, называемый листериозный аллерген. Для установления сенсibilизирующих и антигенных свойств этого препарата трем морским свинкам внутримышечно вводили листериозный аллерген в дозе 1 мл трехкратно с интервалом 7 дней. По истечении двух недель после последней инъекции листериозного аллергена на этих животных ставили внутрикожную аллергическую пробу. У всех трех морских свинок местная аллергическая реакция отсутствовала. При исследовании сывороток крови от этих морских свинок в РА специфические антитела с корпускулярными листериозными антигенами не были обнаружены. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии у исследуемого листериозного аллергена антигенной активности.

В следующей серии опытов оценивали возможность корреляции аллергической реакции с листерионосительством. Опыты проводили на 5 кроликах, которых заражали культурой вирулентного штамма листерий Т-71 в дозе 100 млн м.к. внутримышечно. Через 1 месяц после сенсibilизации на них ставили аллергическую пробу. В последующем аллергическую пробу через каждый месяц повторяли до получения

отрицательной реакции. Результаты исследований обобщены в таблице №14.

Таблица 14 – Результаты аллергической пробы и серологических исследований кроликов, инфицированных листериями.

Сроки исследований	Аллергическая проба +/-	РА	
		+/-	Средний титр антител
Исходный день	0	0	0
1 месяца	5/0	5/0	1:120
2 месяца	5/0	5/0	1:80
3 месяца	4/1	5/2	1:32
4 месяца	3/2	0/5	0
5 месяцев	1/4	0/5	0
6 месяцев	1/4	0/5	0

«+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция

У интактных кроликов аллергическая проба была отрицательной и у них специфические антитела в РА не обнаруживались. Через 1 месяц после инъекции сублетальной дозы листерий все кролики реагировали положительно при постановке внутрикожной пробы с листериозным аллергеном, а также в сыворотках крови обнаруживались специфические антитела в средних титрах 1:120. У всех кроликов положительная аллергическая реакция сохранялась и через 2 месяца после сенсibilизации. Средний титр антител составил 1:80. По истечении 3 месяцев после заражения положительно реагировали 4 кролика (80%) и средний уровень антител составлял 1:32. К исходу 4 месяцев после заражения положительная аллергическая реакция была только у 2 кроликов, а специфические антитела

у них уже не выявлялись. Положительная аллергическая реакция выявлялась у одного из пяти кроликов через 5 и 6 месяцев. Однако специфических антител у него уже не обнаруживалось. Через 6 месяцев после заражения положительно реагировавший на аллерген кролик был усыплен и подвергнут патологоанатомическим и бактериологическим исследованиям. При патологоанатомическом исследовании в легких, сердце, печени, почках и периферийных лимфатических узлах видимых изменений не обнаружили. У одного мезентерального лимфатического узла был гнойный инкапсулированный процесс. Из этого материала при бактериологических исследованиях была выделена культура листерий.

Бактериологическими исследованиями кроликов, реагировавших по аллергической пробе отрицательно, культуры листерий не обнаружили. На основании полученных данных можно констатировать, что аллергическая внутрикожная проба коррелирует с листерионосительством.

Для подтверждения эффективности аллергической диагностики, активности и специфичности полученного аллергена проводили комиссионные опыты. В опытах было использовано 20 морских свинок: 5 интактных, 5 вакцинированных культурой штамма АУФ в дозе 2 млрд м.к. внутримышечно в объеме 1 мл, 5 - инфицированных патогенным штаммом листерий Т-71 в дозе 100 млн м.к. внутримышечно в объеме 1 мл, 5 - вакцинированных культурой штамма сальмонелл ТС-171 в дозе 1 млрд м.к. в объеме 1 мл. Через 1 месяц после сенсibilизации морских свинок ставили аллергическую внутрикожную пробу с листериозным аллергеном. Аллерген вводили внутрикожно в дозе 0,1 мл в область спины. Результаты исследований приведены в таблице №15.

Читку аллергической реакции проводили через 3, 6, 12, 24 и 48 часов. При этом учитывали размер припухлости (диаметр), толщину кожной складки, болезненность, гиперемию и отек. За положительную реакцию

принимали утолщение кожной складки в 1,5-2 раза, диаметр припухлости 15-20 мм.

Таблица 15 – Результаты аллергической реакции на морских свинках (n=5)

№ п/п	Наименования групп	Результаты аллергической пробы (ТКС мм)		
		24 ч	48 ч	Оценка
1.	Интактные	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	Отриц. 5/0
2.	Вакцинированные штаммом АУФ	$3,3 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,1$	Полож. 5/5
3.	Инфицированные штаммом Т-71	$3,4 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$	Полож. 5/5
4.	Вакцинированные сальмонеллами ТС-177	$1,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	Отриц. 5/0

Полученные результаты свидетельствуют о том, что внутрикожная аллергическая проба с листериозным аллергеном является специфичной: у интактных и иммунизированных гетерогенной культурой морских свинок – реакция отрицательная, то есть местная реакция по типу гиперчувствительности замедленного типа отсутствует, тогда как специфическая сенсibilизация вызывает положительную реакцию. Положительная реакция выражалась появлением местной воспалительной реакции после введения аллергена, которая достигала максимума к 24 часам и сохранялась не менее 48 часов. Акт комиссионных опытов прилагается.

### 3.2.6.2 Испытание аллергена на крупном рогатом скоте

В одном из хозяйств Ютазинского района в зимне-весенний период наблюдались энзоотические случаи листериоза. Среди крупного рогатого скота. Клинически отмечались единичные аборты, задержание последа.

У телят проявлялась клиника с поражением центральной нервной системы, угнетенное состояние, судороги, круговые движения. После инъекции препаратов тетрациклинового ряда телята выздоравливали. В связи с этим мы провели аллергическое исследование 18 коров в период сухостоя, находящихся в родильном отделении.

Аллерген вводили в область шеи на выстриженном участке кожи. Место инъекции обрабатывали тампоном с 70% этиловым спиртом. Читку аллергической пробы проводили через 3, 24, 72 часа. У одной коровы реакция оказалась положительной. Толщина кожной складки через 24 часа увеличилась в 1,5 раза, место инъекции было болезненное и горячее, припухлость в диаметре около 18 мм.

Местная реакция полностью исчезла через 72 часа.

При постановке внутрикожной аллергической пробы на 5 телятах 2 месячного возраста у всех животных реакция была отрицательной.

При исследовании сывороток крови от 18 коров в РА с антигеном листерий антитела выявлялись у коровы, давшей положительную аллергическую реакцию. Уровень антител составлял 1:40, что недостаточно для постановки диагноза листериоз. Тем не менее, это свидетельствует о возможности контакта организма с возбудителем листериоза. Бактериологическими исследованиями крови, носовой и влагалищной слизи и выделения из вымени листерий не обнаружили. Полимеразная цепная реакция дала положительный результат только с пробой крови, что свидетельствует о корреляции аллергической пробы с

листерионосительством и ее пригодности для ретроспективной диагностики листериоза.

Отсутствие роста листерий на питательных средах, по-видимому, обусловлено переходом их на не культивируемую форму в процессе взаимодействия макро- и микроорганизмов. Тем не менее положительная полимеразная цепная реакция свидетельствует о персистенции листерий в организме коровы.

Положительная аллергическая реакция с разработанным аллергеном подтверждает эффективность аллергической реакции для ретроспективной диагностики листериоза.

Полученные результаты исследований явились основой для разработки:

- 1) Методических рекомендаций по изготовлению и контролю листериозного аллергена;
- 2) Временных ветеринарных правил по применению листериозного антигена.

## 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Листериоз имеет широкое распространение, поражает многие виды животных и представляет серьезную угрозу здоровью людей. Эта инфекция зарегистрирована во многих странах мира, и не только среди сельскохозяйственных и диких животных, но и периодически возникают эндемические вспышки среди людей [15,145].

Клиника листериоза довольно разнообразна: эта инфекция может проявляться нервными расстройствами, септициемией, ангиной, параличами, абортами и т.д [12].

Возбудитель листериоза не образует спор и капсул, но обладает высокой степенью устойчивости во внешней среде, где он может не только длительно выживать, но и при определенных условиях размножаться [17].

В возникновении листериоза не исключена возможность листерионосительства, которое имеет место у клинически здоровых животных и людей [22]. Однако способ выявления листерионосительства практически не разработан, так как серологические исследования не всегда коррелируются с бактерионосительством, а аллергическая диагностика отсутствует.

В индикации генома возбудителя листериоз может оказаться эффективной ПЦР, которая по данным ряда авторов [6,7,49,103,123] обладает высокой специфичностью и чувствительностью.

Однако для широкого применения ПЦР необходимо расширение исследований и поиск эффективных праймеров и разработка режима проведения ПЦР.

В создании диагностикумов важное значение имеют антигены и аллергены. Однако аллергенная и антигенная активность отдельных полипептидов и фракций клеток листерий практически не изучены. Хотя

эффективность идентификации листерий ПЦР с использованием специфических и произвольных праймеров [59,103].

Разработка аллергенной диагностики может способствовать повышению эффективности диагностики листериоза и выявления листерионосителей.

Целью исследования явилось выделение и изучение аллергенной активности различных фракций полипептидов листерий и оценка эффективности аллергической диагностики листериоза.

Для достижения поставленной цели выдвинуты следующие основные задачи:

- подготовка культур листерий и наработка биомассы;
- фракционирование антигенов листерий и изучение их аллергенных свойств;
- определение электрофоретических профилей полипептидов лизатов клеток разных штаммов листерий и аллергенов;
- установление диагностической эффективности листериозного аллергена и аллергической внутрикожной пробы.

В решении выдвинутых задач первым этапом наших исследований являлось изучение отдельных биологических свойств листерий после длительного хранения (6-7 лет).

В опытах использовали: вакцинный штамм (*L.monocytogenes*) –АУФ и референтные штаммы- 9-127, 9-128, 9-129, 9-130 и эпизоотические – Т-71, 2797 – первого и второго серотипов, выделенные от различных животных в разных регионах.

Вакцинный штамм АУФ и вышеперечисленные референтные и эпизоотические штаммы поддерживали на среде Китта-Тароцци под вазелиновым маслом путем периодических пересевов. Кроме того,

вакцинный штамм АУФ хранили в лиофилизированном состоянии во флаконах, заполненных азотом.

Ллиофилизация была произведена в сахарозо-желатиновой среде. Жидкие и лиофилизированные штаммы листерий хранили при температуре 2..4°C в условиях холодильника.

Исследуемые штаммы освежали путем посева в мясопептонный бульон. Затем производили посевы на питательные среды (с гидролизатом лактоальбумина, бульон и агар Хоттингера).

Изучали морфологические свойства культур путем микроскопирования мазков, окрашенных по Граму. Ферментативную активность определяли на средах Гисса.

Для определения патогенности производили заражение белых мышей массой 16-18г.

Штаммы листерий после пересева из полужидкого агара Китта-Тароцци, после длительного хранения, давали рост в МПБ с глюкозой и в бульоне Хоттингера через 6-10 суток. После посева из лиофилизированного флакона, хранившегося под азотом, культура вырастала через 18-24 часа. Наши результаты по длительному выживанию листерий при температуре +4°C согласуются с данными других исследователей, предлагающих при выделении их из загрязненных объектов путем инкубации при этой температуре [60,61].

Изучение культурально-морфологических свойств штаммов после освежения и трех последовательных пересевов показало, что все штаммы сохраняли исходные показатели. Однако вирулентность патогенных штаммов была снижена. После 2-3 пассажей через организм белых мышей вирулентность патогенных штаммов повышалась. Аналогичные данные отмечали и другие исследователи [26].

Биохимическая активность культур листерий после освежения соответствовала характерным для этого рода показателям: окрашивались по Граму положительно, в молодых культурах обладали подвижностью, агглютинировались полиспецифической и соответствующей типовой сывороткой, ферментировали глюкозу, левулезу, салицил, рамнозу и не расщипляли сахарозу, дульцит, инулин и сарбит, продуцировали сероводород, обладали каталазной и гемолитической активностью. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей [92,149].

Все изучаемые штаммы при культивировании в МПБ при 22°C проявляли подвижность. Их подвижность угнеталась инкубацией при 37-38°C, особенно в глюкозных питательных средах. Аналогичные данные приведены в ряде других сообщений авторов, которые отмечали, что *Listeria monocytogenes* не способны образовывать жгутики при высокой температуре в питательных средах, содержащих глюкозу [61,124].

Для изучения антигенов листерий возникла необходимость разрушения клеток. Поэтому мы апробировали УЗ – воздействие. Однако, как показали дальнейшие опыты, листерии проявляют высокую устойчивость к действию ультразвука. Высокая устойчивость листерий к ультразвуку, по-видимому, обусловлена строением клеточной стенки. У грамположительных бактерий, к числу которых относится и *Listeria monocytogenes*, содержание пептидоглюкана составляет почти 50-90% сухой массы клеточной стенки, которая обеспечивает её прочность и ригидность [14,128].

Следующим этапом наших исследований явилось изыскание эффективного способа лизирования клеток листерий. В этом аспекте обработка их детергентной смесью, состоящей из додецил сульфата натрия (5%) и меркаптоэтанола (5%) в 0,125 М растворе HCl буфера при 100°C в течение 5 мин. Наиболее эффективным способом фракционирования

полипептидов листерий является электрофорез в ПААГе лизатов, полученных обработкой детергентной смесью. В их составе выявлялись более 50 фракций с молекулярной массой от 10 до 70 кДа.

Установленное нами близкое сходство белкового состава (полипептидов) у разных штаммов листерий свидетельствует о генетической однородности вида *Listeria monocytogenes*, что согласуется с результатами генотипирования их по нуклеотидному составу [15,198].

Для получения аллергена использовали экстракцию слабыми растворами кислот, щелочи и детергента.

Результаты наших исследований показали, что иммунизация и заражение животных листериями сопровождаются выработкой реакции гиперчувствительности замедленного типа, которая выявлялась внутрикожной аллергической пробой.

Антигены листерий, полученные экстракцией слабыми растворами кислот, щелочей обладали аллергенной активностью. Аллергенной активностью обладал и корпускулярный препарат. Однако аллергическая реакция на корпускулярный препарат сопровождалась некротическим эффектом.

По результатам сравнительных анализов наиболее эффективным оказался препарат, полученный экстракцией биомассы листерий ДДС-Na, который давал выраженную аллергическую реакцию у сенсibilизированных животных. После введения аллергена внутрикожно воспалительная реакция появлялась через 16-18 часов, которая проявлялась в виде покраснения, болезненности, припухлости и утолщения кожной складки в 1,5 – 2 раза. Диаметр припухлости составлял 18-20 мм. Местная воспалительная реакция у сенсibilизированных животных сохранялась не менее 48 часов, затем постепенно угасала.

Следует отметить, что аллерген, полученный экстракцией биомассы листерий ДДС-На, представлял из себя низкомолекулярный полипептид (М.м. - 12,0 кДа), не вызывал сенсибилизацию и выработку специфических антител и надежно позволял выявить сенсибилизированных листериями животных. Наши исследования показали, что внутрикожная аллергическая проба со специфическим аллергеном позволяет поставить диагноз на листериоз и обеспечивает выявление листерионосителей.

В опытах на крупном рогатом скоте продемонстрировано отсутствие неспецифических реакций на аллерген, а также подтверждена возможность использования внутрикожной аллергической пробы для ретроспективной диагностики листериоза.

Эффективность полученного листериозного аллергена и аллергической диагностики листериоза подтверждена комиссионными опытами (акт прилагается).

На основании результатов проведенных исследований нами подготовлены:

- 1) Методические рекомендации по изготовлению и контролю листериозного аллергена, одобренные НТС (протокол № 1 от 11.03.2020г.) и утверждены ректором ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» 12.03.2020г,
- 2) Временные ветеринарные правила по применению листериозного аллергена, утверждены начальником главного управления ветеринарии кабинета Министров Республики Татарстан от 15.03.2021г.

В дальнейшем планируется более детальное изучение эффективности аллергической диагностики листериоза в условиях производства.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Установлено длительное сохранение жизнеспособности и исходных культурально-морфологических и других биологических свойств штаммов листерий при хранении в лиофилизированном состоянии в сахарозо-желатиновой среде под азотом, а также при хранении путем периодических пересевов в полужидком агаре Китта-Тароцци под вазелиновым маслом при температуре 2...4°C. Однако, при длительном хранении листерий происходило снижение их вирулентных свойств, которые восстанавливались после 2-3 пассажей через организм чувствительных животных (белые мыши).

2. Клетки листерий проявляли высокую устойчивость к воздействию ультразвука и практически не разрушались при озвучивании в течение 60-80 мин интенсивностью 35 кГц и силе тока 0,3 А.

3. Обработка бактериальных клеток детергентной смесью, способствовала полному лизису и расщеплению клеточных структур с освобождением широкого спектра полипептидов с различными молекулярными массами.

4. В составе детергентных лизатов листерий путем электрофореза в ПААГе выявлялись до 51 полипептида с молекулярной массой от 10 до 73 кДа. У всех штаммов обнаруживались сходные электрофоретические профили, что свидетельствует о близкой однородности белкового состава штаммов представителей разных серотипов *Listeria monocytogenes*.

5. Вакцинация и инфицирование лабораторных животных сопровождалась выработкой ГЧЗТ, которая выявлялась аллергической внутрикожной пробой со специфическим аллергеном.

6. Листерийный аллерген, полученный экстракцией биомассы листерий ДДС-Na, обладает высокой специфической аллергенной активностью, не

вызывает сенсibilизацию организма и синтеза антител у животных при повторных инъекциях, обеспечивает эффективную ретроспективную диагностику листериоза и листерионоительства.

## **5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Для ретроспективной диагностики листериоза и листерионосительства рекомендуется специфический листериозный аллерген, изготавливаемый в соответствии «Методических рекомендаций по изготовлению и контролю листериозного аллергена» одобренных НТС академии (протокол № 1 от 11.03.2021г.) и утверждённых ректоратом ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» 11.03.2021г. и «Временных ветеринарных правил по применению листериозного аллергена» утверждённых начальником главного управления ветеринарии кабинета Министров Республики Татарстан от 15.03.2021г.

2. Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедрах биохимии, физики и математики, микробиологии, вирусологии и иммунологии, физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	- антиген
АТ	— антитело
БХ	— бульон Хоттингера
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДДС-Na	— додецилсульфат натрия
ГЧЗТ	— гиперчувствительность замедленного типа
КОЕ	— колониеобразующие единицы
м.к.	— микробная клетка
М.м.	— молекулярная масса
МПА	- мясо-пептонный агар
МПБ	- мясо-пептонный бульон
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
ПААГ	— полиакриламидный гель

## 6 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимов, А.М. Синтетическая элективная среда для выделения листерий/ А.М. Алимов, О.А. Котылев, Н.З. Хазипов// Авт. свидетельство № 784334 от 1 августа 1980г.
2. Алимов, А.М. Изучение аминокислотного обмена и иммунохимии листерий различной вирулентности: Автореф. дисс. канд. биол. наук. –Казань, 1974. - 28с.
3. Алимов, А.М. Сравнительная оценка питательных сред при культивировании листерий штамма АУФ/ А.М. Алимов, О.А. Котылев// Ученые записки КГВИ. Том 119. Казань, 1975. – С. 158-162.
4. Алимов, М.А. Выявление *Listeria monocytogenes* в объектах ветеринарного надзора/ М.А. Алимов// Ветеринарная патология. – 2003. - №1(5). – С.141-142.
5. Алимов, М.А. Контаминированность продуктов и кормов *Listeria monocytogenes*/ М.А. Алимов, Т.Х. Фаизов, Т.Я. Сазонова// Мат. Научно-производственной конф. по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии (часть I). – Казань. – 2002. –С.5-6.
6. Алимов, М.А. ПЦР-анализ контаминированности продуктов и кормов *Listeria monocytogenes*/ М.А. Алимов// Сборник тезисов 4-ой Всероссийской научно-практической конф. «Генодиагностика инфекционных заболеваний» - Москва. – 2002. – С.315-317.
7. Аскарова, А. Н. ПЦР в анализе генома: учебно-методическое пособие к занятиям по курсу «ДНК-диагностика». - Казань, 2000. -34с.
8. Астапович, Л.Г. Изменение морфологии листерий в зависимости от температуры инкубирования / Л. Г. Астапович, И. А. Бакулов, В.

М. Котляров, З. Н. Меньшикова, О. Ю. Сакович//Ветеринария, 1966. -№ 10. - С. 14-17.

9. Бакланов, Н.Л. Аллергия к микробам в клинике и эксперименте/ Н.Л. Бакланов, Г.С. Суходоева - М. 1979. – 87с.

10. Бакулов, И. А. Бактериологический контроль пищевых продуктов на наличие листерий. Методическое пособие / И. А. Бакулов, Д.А. Васильев// - Ульяновск, 1999. -78 с.

11. Бакулов, И. А. Листерия как пищевая инфекция. Вопросы диагностики и профилактики: учебное пособие / И. А. Бакулов, Д.А. Васильев// - Ульяновск, 1991. –С. 23-29с.

12. Бакулов, И. А. Листерия сельскохозяйственных животных / И. А. Бакулов, -М.: Колос, 1967. - 296с.

13. Бакулов, И.А. Идентификация листерий с помощью метода молекулярной ДНК — ДНК гибридизации / И. А. Бакулов, В. М. Котляров, Т. П. Турова, Н. Б. Бакалдина, Т.Т. Иванова// Молекулярная генетика микробиология и вирусология, 1987. - №7. - С.31-35.

14. Бакулов, И.А. Листерии и листериоз: монография / И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, Д. В. Колбасов, Т. И. Кольпикова, Ю. О. Селянинов, И. Ю. Егорова. Ульяновск: УГСХА, 2008. - 168 с.

15. Бакулов, И.А.Листерия (листериоллез). В кн: Эпизоотология с микробиологией. - Ульяновск: М., 1965. – С.142-147.

16. Бакулов, И.А. Основные вехи истории изучения листериоза животных и людей// Материалы межд. симп. «Листерия на рубеже тысячелетий» - Покров, 1999. - С. 43-47.

17. Бакулов, И.А. Листерия как пищевая инфекция/ И.А. Бакулов, Д.А. Васильев. - Ульяновск, 1991. -36с.

18. Белоусов, В.Е. Листерия и аллергия/ В.Е. Белоусов, В.М. Котляров, Д.А. Васильев. – Покров, 1983. – С. 157-162.

19. Белый Ю.Ф. Тартаковский С.И. и др., Характеристика белков клеточной стенки *L.monocytogenes* // Тезисы докладов научно-производственной конференции "Медико-ветеринарные аспекты листериоза", Покров, 1993, - С. 31-32.
20. Богданов, И.Л. Аллергия в патогенезе, клинике и терапии инфекционных болезней [Текст] / И. Л. Богданов. — М.: Медицина - 1974. -с.
21. Бойко, А. В. Рибонуклеазная активность бактерий как фактор персистенции некоторых возбудителей сапронозных инфекций / А. В. Бойко, О. В. Бойко// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1997. -№4 - С. 71-73.
22. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов, А. М. Смирнова, И. С. Фрейдлин и др. - М.: Медицина, 1994. - 528 с.
23. Брудастов, Ю. А. Антикомплементарная активность бактерий: Автореф. дис. канд. мед. Наук. — Челябинск, 1992. - 22с.
24. Бутко, М.П. Исследования по изысканию элективной среды для выделения возбудителя листериоза из органов и тканей убойных животных // Труды ВНИИВС, 1972. -Т.XLI. - 126с.
25. Бухарин, О. В. Антилизоцимный тест как маркер персистенции микроорганизмов / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвятцов // Теоретическая и прикладная иммунология: тез. докладов 1 Всесоюз. конф. М., 1982. - С. 58-64.
26. Бухарин, О. В. Биомедицинские аспекты персистенции бактерий / О. В. Бухарин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1994. -№8. - С. 4-13.

27. Бухарин, О. В. Персистенция патогенных бактерий: теория и практика/ О. В. Бухарин// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2000. - № 4. – С. 4-7.
28. Бухарин, О.В. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвятцов, А. П. Малышкин, Н. В. Немцева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1984. -№2. -С. 27-28.
29. Вафин, Р.Р. Способ выделения ДНК микроорганизмов/ Р.Р. Вафин, Л.И. Зайнуллин, Т.Х. Фаизов, Р.Х. Равилов, А.М. Алимов// Патент на изобретение №2230120 от 8 апреля 2002г.
30. Воронина, О.А. Листерия: генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения/ О.А. Воронина, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжова и др.// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т.21. - №4. – С.261-273.
31. Герхард, Ф. Методы общей бактериологии/ Ф. Герхард и др. // ТЗ. М. «Мир», - 1984. – С. 21-24.
32. Гершун, В. И. Распространение и жизнеспособность листерии в объектах внешней среды и влияние температурного фактора на их морфологические свойства / В. И. Гершун // Вопросы природной очаговости болезней, -Алма-Ата, 1981. -Вып. 12. - С. 78-89.
33. Дмитренко, Н. В. Основы статистической обработки результатов микробиологических и вирусологических исследований / Н. В. Дмитренко. -Покров, 1993. - 38с.
34. Домардский, И. В. Вирулентность бактерий как функция адаптации/ И. В. Домардский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1997. - №4. - С. 16-20.

35. Егорова, И. Ю. Методические рекомендации по определению гемолитической активности культур рода *Listeria* / И. Ю. Егорова, Ю. О. Селянинов. -Покров, 2005. – 8с.
36. Ермолаева, С. А. Ауторегуляция экспрессии секретируемых белков у *L. monocytogenes* / С. А. Ермолаева, Ю. Ф. Белый, И. С. Тартаковский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2000. -№5. -С. 3-6.
37. Ермолаева, С. А. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий/ С. А Ермолаева, Ю. Ф. Белый, И. С. Тартаковский // Молекулярная генетика микробиология и вирусология, 2000. -№1. - С. 17-19.
38. Ермолаева, С. А. Белый Ю. Ф., Тартаковский И. С. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий//Мол. ген. микробиол. Мирусол, 2000. -№ 1. -С. 17–19.
39. Жаргалова, Т.Т. Котляров В.М., Цыбанов С.Ж. Современные методы типирования листерий // Сб. статей: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных. –Покров, 2000. -С.252-255.
40. Зайцева, Е. А. Распространение *Listeria monocytogenes* среди мышевидных грызунов на территории приморского края / Е. А Зайцева, С. А.Ермолаева, Г. П. Сомов // Тихоокеанский медицинский журнал, 2008. - № 2. - С. 65-69.
41. Зайцева, Е. А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоковирулентных штаммов *Listeria monocytogenes*: Автореф. дис. докт. мед. наук: 03.02.03. – М, 2010. - 40с.

42. Зайцева, Е.А. Листерия / Е.А. Зайцева Г. П. Сомов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2006. - №2. - С. 3-6.
43. Зайцева, Е.А. Микробиологическая характеристика *Listeria monocytogenes*, изолированных из различных источников в Приморском крае/ Е.А. Зайцева, Г.П. Сомов// Ж. микробиология, 2006. - №2. – С. 3-6.
44. Зайцева, Е.А. Эколого-эпидемические особенности *Listeria monocytogenes* в Приморском крае/ Е.А. Зайцева, В.Е. Терехова// Тихоокеанский мед. Журнал, 2001. - №2. – С. 29-31.
45. Зарифуллина, Л.А. Антилизотическая активность менингококков: Автореф. дис. канд. мед. наук. - Челябинск, 1986. - 26с.
46. Зеелигер, Х. Листерия /Перев. с немецк. С.Е. Огрызкова, Н.С. Балыбердина. –М, 1959. - 303с.
47. Зобнина, К.С. Аллергенные фракции бактерий семейства кишечных. Сообщение I. Иммунохимическая и аллергическая характеристика препаратов, полученных по методу Андо-Вержаковского из разных штаммов одного вида (*Enterobacter cloacae*)/ К.С. Зобнина, А.Н. Маянский// - Ж. микробиология, 1972. - №2. – С. 67-72.
48. Карпеев, С. А. Листерия / С. А. Карпеев, Ф. З. Амфитеатров// Материалы докл. науч. конф., поев. 40-летию ТАССР Казань, 1960. - С.75-76.
49. Карпова, Т.И. Идентификация и типирование *Listeria monocytogenes* на основе особенностей полиморфизма и экспрессии генов факторов патогенности. Автореферат к.б.н.- Москва. – 2003. – 23с.
50. Карпова, Т.И. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes*/ Т.И. Карпова, И.В. Лопырев и др.// Клин. микроб., антимикробная химиотерапия, 2001. – 3(3). – С. 266 – 273.

51. Книзе, А.В. Эпизоотическая ситуация по листериозу в странах мира и России /А.В. Книзе, А.И. Бузун// В сб.: Листериоз на рубеже тысячелетий. –Покров, 1999. - С. 118-122.
52. Козлова Д.И. Научно-производственная конференция "Медико-ветеринарные аспекты листериоза"/ Д.И. Козлова, В.М. Котляров, И.А. Бакулов// Вестник Рос.Акад. с/х наук. 1994,- С. 57-58.
53. Колесниченко, Н.Ф. Способ получения бактериального аллергена/ Н.Ф. Колесниченко, Л.Г. Подгорная, С.В. С.В. Бирюкова// РЖБ микробиология, 1975. - №11. – С. 122 - 123.
54. Колычев, Н.М. Руководство по микробиологии и иммунологии/ Н.М. Колычев, В.Н. Кисленко, А.Г. Белов, Р.Г. Госманов и др.// ИНФРА – М, 2018. – 230с.
55. Кольпикова, Т. И. Котляров В. М., Фирсова Т. Е. Опасна ли *Listeria in posua*? // Сб. статей: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных. – Покров, 2000. - С. 273–274.
56. Кольпикова, Т.И. Использование листериозных бактериофагов при диагностике и индикации листерий/ Т.И. Кольпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // В сб.: Листериоз на рубеже тысячелетий. –Покров, 1999. - С. 64-67.
57. Коляков, А.Е. Ветеринарная иммунология/ А.Е. Коляков// М.: Агропромиздат, 1996. – 272с.
58. Красовский, В. В. Итоги пятилетнего изучения листериоза на Украине/В.В. Красовский, Н.В. Васильев, С.А. Деркач, С.И. Похил// Микробиология, 2000. -№ 3. -С. 80–85.
59. Красовский, В.В. Разработка и апробация метода полимеразной цепной реакции для детекции возбудителя листериозной инфекции/В.В.

Красовский, С.И. Похил, А.П. Лиманский, О.Ю. Лиманская, Е.Н. Тимченко // Клиническая лаб. Диагностика, 2000. -№6. -С.37-41.

60. Кривоносова, О.В. Изыскание элективных питательных сред для выделения листерий/ О.В. Кривоносова, П.П. Мелехов И.А. Бакулов // Ветеринария, 1970. -№9. -С. 48-50.

61. Круг, Н.В. Получение и накопление чистых культур/ Методы общей бактериологии. - М.: Медицина, 1983. – Т.1. – С. 279-280.

62. Лабораторная диагностика листериоза животных и людей, меры борьбы и профилактики: методические рекомендации / Госагропром, МЗ СССР. -М., 1987. - 32с.

63. Лабораторная диагностика листериоза животных и людей: методические рекомендации / Минздравмедпром РФ, Минсельхозпрод РФ. - М., 1996. - 28с.

64. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. - 3-е изд., перераб. и доп.- М.: Высш. школа, 1980. - 293с.

65. Листериоз. Методические рекомендации (№11). Н.А. Малышев (главный специалист по инфекционным болезням и СПИДу Комитета здравоохранения), утверждено А.П. Сельцовским. - Москва, 2001. – 45с.

66. Лобан, К. М. БЖЭ. 3-е изд. / К. М. Лобан, В. П. Бисерина, И. В. Тороповцев, Г. В. Борисова. - М., 1980. - С. 200-204.

67. Малеев, В. В. Опасные инфекции: листериоз / В. В. Малеев // Сестринское дело, 2000. - №4. - 235с.

68. Маненкова, Г.М. Эпидемическая ситуация по листериозу в г. Москве/ Г.М. Маненкова, Л.В. Родина, Л.А. Цвиль // Сб. статей: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных. –Покров, 2000. - С. 258-264.

69. Маннапова, Р.Т. Микробиология и микология. Особо опасные инфекционные болезни, микозы и микотоксикозы/ Р.Т. Маннапова// ИНФА – М, 2018. – 334с.
70. Маракуша, Б.И. Характеристика штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных в России и их типирование с помощью пульс-электрофореза/ Б.И. Маракуша, К. Дарвиш, И.С. Тартаковский /Журн. Микробиология, 1996. -№3. -С. 60-64.
71. Меньшикова, З. Н. Актуальные вопросы ветеринарной медицины: электронно — микроскопическая идентификация листерий возбудителей пищевого листериоза / З.Н. Меньшикова, Е.В. Тищенко; - ФГОУ ВПО Уральская ГАВМ, 2005. - С. 67-68.
72. Меньшикова, З. Н. Электронно-микроскопическое изучение морфологии листерий и эризипелотрикссов: Автореф. дис. канд. биол. наук. - Покров, 1971. - 24с.
73. Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей. - М., 1987. – 68с.
74. Минаева, Н.Э. Микробиологические аспекты эпидемиологии листериоза/ Н.Э. Минаева, В.И. Ладный / Матер. междунар. симпозиума. –Покров, 1999. -С. 136 -137.
75. Москаленко, В. Ф. Биологические свойства и патогенный потенциал листерий, циркулирующих в Украине / В. Ф. Москаленко // Провизор, 1998. -№ 14. – С. 57-58.
76. Мусаева, А.К. Диагностика листериоза животных и биологические свойства листерий / А.К. Мустаева, Н.Н. Егорова, А.Т. Даугалиева, М.К. Кожабаев, А.К. Досянова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований – 2016. -№3. – С.483-489.

77. Нымм, Э.М. Словарь ветеринарных микробиологических терминов/ Э.М. Нымм, К.А. Питерсон, Я.В. Алаотс, Э.А. Аавер (и др.). – М: Росагропромиздат, 1989. – 175с.
78. Омаров, С.М. Питательные среды для выделения и накопления листерий. С.М. Омаров, Ш.М. Меджидов, Э.М. Ахметов// - ЖМЭИ, 2000. – С. 45-48с.
79. Онищенко, Г. Г. Эпидемиология и профилактика листериоза: методические указания 3.1.7.1104-02 / Г. Г. Онищенко. - М., 2002.
80. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / методические указания 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2004. - Т.6. -№4. - С. 306-359.
81. Петров, О.В. Серологическая типизация листерий с помощью реакции агглютинации /О.В. Петров// Бюлл. Всес. ин-та экспер. вет., 1971. -№11. -С. 59-62.
82. Петров, Р.В. Иммунология и иммунитет/ Петров Р.В.// -М.: «Медицина», 1976. – 388с.
83. Петров, Р.В. Иммунология и иммуногенетика/ Р.В. Петров// -М.: «Медицина», 1976. – 168с.
84. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учеб. пособие / О. К. Поздеев; под ред. В. И. Покровского Изд. 4-е, испр. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – С. 302-304.
85. Прозоровский, С. В. Ы-формы бактерий (механизмы образования, структура, роль в патологии) / С. В. Прозоровский, Л. Н. Кац, Г. Я. Каган// - М., 1981. - 175с.
86. Рунова, В.Ф. Сравнительное изучение аллергенных фракций, полученных из разных штаммов стафилококков/ В.Ф. Рунова, Т.М. Поляков, Л.М. Лодинова// Ж. Микробиология, 1998 - №8. – С. 96-100.

87. Садовников, Н.Г. Иммунопатофизиология животных/ В.Н. Садовников, В.Н. Байматов, Б.Г. Юшков// - Екатеринбург, 2007. – 254с.
88. Саики, Р., Галентен У., Эрлих Г. Полимеразная цепная реакция /В кн.: Анализ генома. Методы. Под. ред. К. Дейвинга. Перев. с англ. Рудина А.В. с соавт. -М. "Мир",1990. - С. 176-190.
89. Середа, А.Д. Иммунитет при листериозе/ А.Д. Середа, В.М. Котляров, И.А. Бакулов// - Ж-л микробиология, 2000. -102с.
90. Сливко, В. В. Листериоз сельскохозяйственных животных / В. В. Сливко// - Вологда, 1954. - 145с.
91. Сомов, Г. П. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: экологические аспекты / Г.П. Сомов, В. Ю. Литвин. - Новосибирск: Наука, 1988. - 208с.
92. Староверов, С. А. Биохимические характеристики различных штаммов листерий: автореферат дис. кандидата ветеринарных наук: 16.00.03/ С.А. Староверов// Казанская гос. акад. вет. медицины. - Казань, 1998.
93. Степанюк, В.Д. Эпизоотический словарь/ В.Д. Степанюк, В.П. Литвин// Эпизоотологический словарь. – Киев. «Урожай», 1976. – 120с.
94. Стоянов, Д.М. Экспериментальное заражение белых мышей и морских свинок *Listeria innocua*/ Д.М. Стоянов, Х.С. Манев, Шиндарева И.О.// Эпидемиол., микробиол. и инфекц. Болезни, 1981. -№4. - С. 380-387.
95. Сухотина, В. П. Выживаемость листерий в почвах под влиянием ризосферы некоторых растений: Автореф. дис. канд. вет. наук /- Новосибирск, 1978. - 22с.
96. Тартаковский, И. С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и животных/ И.С. Тартаковский, В.В. Малеев, С.А. Ермолаева// - М.: Медицина для всех; 2002. - 200 с.

97. Тартаковский, И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика/ И.С. Тартаковский// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2000. – №10. – 68с.
98. Тимаков, В.Д. Микробиология/ В.Д. Тимаков, В.С. Левашова, Л.Б. Баринов// М.: «Медицина», 1983. – 512с.
99. Тимофеева, Л. А., Головачева Л. Я., Трофименко Н. З. Доклад Иркутского противочумного института. Т. 4. Иркутск, 1962. – С. 208-210.
100. Токаревич, К.Н. Важнейшие инфекционные болезни, общие для человека и животных/ К.Н. Токаревич// М.: Медицина. – 1979. – 224с.
101. Тукшаитов, Р.Х. Статистические методы построения эмпирических формул: учеб. пособие студ. вузов. - КНИТУ-КАИ. – Казань, 2001.
102. Фаизов, Т.Х. Применение ПЦР для идентификации возбудителя листериоза/ Т.Х. Фаизов, Н.М. Гришкевич, М.А. Алимов// Мат. юбилейной научной конф. Центра военно-технических проблем посвящ, 50-летию биохимической защиты НИИ микробиологии МО РФ «Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария. – Екатеринбург. – 1999. -250с.
103. Фаизов, Т.Х. Произвольные правймеры: Новые возможности идентификации бактерий/ Т.Х. Фаизов, М.А. Алимов// Мат. Международ.конф. посвященной 70-летию образования зоотехнического факультета КГАВМ. Инфекционные болезни. – Казань. – 2000. – С.141-142.
104. Хоулта, Дж. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т., Т. 2 пер. с англ; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир, 1997. – С. 573-577.

105. Чевелев С.Ф., Бакулов И.А. и др. Новое в патогенезе листериоза животных. // в кн. Актуальные проблемы патологоанатомической диагностики болезней животных, Л., 1982, - С. 206-207.
106. Шапиро, Н.И. Материалы к физико-химической характеристике препаратов нативного и очищенного дизентерина/ Н.И. Шапиро, Н.П. Денисова// Ж. микробиологии., 1970, № 4, с. 72-77.
107. Шафикова, Н.Э. Влияние углеводов на теплопродукцию покоящихся культур листерий/ Э.Н. Шафикова// Актуальные проблемы животноводства и ветеринарии. Мат. Республиканской научно-производственной конференции. – КГАВМ. – Казань, 1999. – 67с.
108. Шафикова, Н.Э. Теплопродукция разных штаммов листерий при культивировании в синтетической и искусственной питательных средах/ Н.Э. Шафикова, А.М. Алимов// Актуальные проблемы ветеринарной медицины, животноводства, общественности и подготовки кадров на Южном Урале. УГИВМ. – Троицк, 1999. – 4.1. – С. 125-126.
109. Шлегель, Г. Общая микробиология/ Пер.с нем. – М.: Мир, 1987. – 567с.
110. Шлыгина, К.Н. Типовая принадлежность штаммов листерий, выделенных в СССР. // ЖМЭИ, N12, 1963,- С. 90-94.
111. Штейтман, К. Получение клеточной фракции. Методы общей бактериологии/ К. Штейтман, под ред. Ф. Герхард и др. Перевод с англ. Е.Н. Кондратьевой, Л.В. Колодуцкого// М.: «Мир», 1983. – Т.1. – С. 138 – 140.
112. Штейтман, К. Разрушение ультразвуком. Методы общей бактериологии/ К. Штейтман// М. «Мир». 1983. – Т.1. – С.142-143.
113. Эпидемиология и профилактика листериоза. Методические указания МУ 3.1.7.110.

114. Aires, J. R. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides / J. R. Aires, T. Kohler, H. Nikaido, and P. Plésiat // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. - Vol. 43. - №11. - P. 2624-2628.
115. Bergey, D.H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Book Review* *Int. J. of Syst. Bac/ D.H. Bergey*// July 1985, p. 408.
116. Bergmann, B. Inl A- but not Inl B-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins / B. Bergmann, D. Reffelsbauer, M. Kuhn et al. // *Mol. Microbiol.*- 2002.- Vol. 43.- P. 557575.
117. Boerlin, P. Subtyping *Listeria monocytogenes* isolates genetically related to Swiss epidemic clone/ P. Boerlin, E. Bannerman, T. Jemmi, J. Bille // *J. Clin. Microbiol.* -1996. 34: 2148-2153.
118. Boerlin, P. Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human *Listeriosis* cases/ P. Boerlin, F. Boerlinpetzold, E. Bannerman, J. Bille, T. Jemmi// *Appl. ENVIR. Microbiology.* -1997. 63: 1338-1343.
119. Boucher, M. Adult respiratory distress syndrome: a rare manifestation of *Listeria monocytogenes* infection in pregnancy/ M. Boucher, M.L. Yonekura, R.J. Wallace, J.P. Phelan // *Am. J. Obstet. Gynecol.* -1984. -149: 686-688.
120. Braude, A. I. *Microbial Perturbation of Host Defences* / A. I. Braude, F. O'Grady, H. Smith (ed.) // *Academic Press Inc.* - London, 1981. - P. 13.
121. Breer, C. *Listeria* and food/ C. Breer, K. Schopfer // 1988. *Lanceti*: 1022.
122. Brehm, K. The *bur* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by Bglucosides / K. Brehm, M. T. Ripio, J. Kreft, J. A. Vazquez-Boland // *J. Bacteriol.*- 1999.- Vol. 181.- P. 5024-5032.

123. Brosch, R., Chen J., Luchansky J.B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeria*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar/ R. Brosch, J. Chen, J.B. Luchansky // *Appl. Environ. Microbiol.* -1994. -60: 2584-2592.
124. Conner, D.E. Pathogenicity of foodborne, environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice/ D.E. Conner, N. Scott Virginia, S. Sumner Susan, T. Bernard Dane// *J. Food. Sci.* -1989. -54. -№6. -C. 1553-1556. -АНГЛ.
125. Cossart, P. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling / P. Cossart, M. Lecuit // *EMBO J.* 1998. - Vol. 17. - P. 3797- 3806.
126. Cossart, P. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation / P. Cossart, M. F. Vincente, J. Mengaud, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, P. Berche // *Infect. Immun.* 1989. - V. 57.- P. 3629-3636.
127. Czuprynski, Charles J. Interaction of rat platelets with *Listeria monocytogenes* / Charles J. Czuprynski, Edward Balish // *Infection and Immunity.* 1981. -Vol. 33. -№. 1.-P. 103-108.
128. Datta, A.R., Synthetic oligode-oxyribonucleotide probes for detection of *Listeria monocytogenes*/ A.R. Datta, B.A. Wentz, D. Shook end M. Trucksess // *Appl. Environ. Microbiology.* -1988. -№54. -P.2933-2937.
129. Doganay, M. Listeriosis: clinical presentation// *Immunol. Med. Microbiol.* 2003; 31 (3):173–175.
130. El-Gezzar, F. E. *Listeria monocytogenes*, Listeriosis and responses of the pathogen to environmental conditions/ F. E. El-Gezzar, E.H. Marth // *Milchwissenschaft.* -1991. -46. -№1. -C.14-19.

131. Fan L., A scid mouse Model for the Pathogenetic and Therapeutic Analysis of Oral Listeriosis, Leading of potentially fatal CNS-Disease/ L. Fan, D.A. Portnoy, // XII International symposium of problems of listeriosis, Perth, 1995, -p.48.
132. Farber, J.M. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen/ J.M. Farber, P.I Peterkin // Microbiol. -1991. Rev. 55: 476-511.
133. Fensterbank, R. Etude des souches de *Listeria* isolees d'animaux malades et de l'ensilage consomme / R. Fensterbank, A. Audurier, J. Godu, P. Guerrault // Ann. rech. vet. -1984. -15. -№1. -P.113-118.
134. Feteanu, A. Identifizierung und typisierung von *Listeria monocytogenes* mit hilfe von fluoreszierenden Antikörpern/ A. Feteanu, P. Darie, P. Jorgielescu // In.: Probleme der Listeriose. symposium. 16-17 mai 1968 in Leipzig. Leipzig. -1969. -P.79-85.
135. Gellin, B.G. Listeriosis/ B.G. Gellin, C.V. Broome //JAMA. -1989. -261: 1313-1320.
136. Gembruch, U., Listeriosis: a cause of non-immune hydrops fetalis / U. Gembruch, M. Niesen, M. Hansmann, G. Knopfle // Prenat. Diagn. -1987. -7. -№4. -C.277-282.
137. Gierowska-Bogusz, B. Clinical and laboratory diagnosis of *Listeria monocytogenes* on the basis of own investigations/ B. Gierowska-Bogusz, K. Nowicka, H. Drejewicz // Med. Wieku Rozwoj. 2000; 4 (2 Suppl 3): 89–96.
138. Girmenia, C., Listeriosis in recipient of allogeneic bone marrow transplants from unrelated donors/ C. Girmenia, A. P. Iori, S. Bernasconi, A. M. Testi et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2000; 19 (9):711–714.
139. Gouin, E. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species / E. Gouin, J. Mengaud, P.Cossart // Infect Immun.- 1994.- Vol. 62.- P. 3550-3553.

140. Groves, R.D., Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three in vitro reactions/ R.D. Groves, H.J. // *Welshimer J.Clin.Microbiol*, 1977,N5,-p.559-566.
141. Hamon, Y, Etude du pouvoir bacteriocinogene dans le genre *Listeria*.  
2. Individualité et classification des bacteriocines en cause / Y. Hamon, Y. Peron // *Annales De L Institut Pasteur*. 1963. - Vol. 104. - № 1. - P. 55.
142. Hancock, R. E. Antagonist activity medicinal chemistry-38 / R. E. Hancock // *Clin Inf Dis*. 1998. - Vol. 27. - S. 93-99.
143. Hao, D.Y.-Y. Comparison of media and methods for detecting and enumerating *Listeria monocytogenes* in refrigerated cabbage/ D.Y.-Y. Hao, L.R. Beuchat, R.E. Brackett // "*Appl. and Environ. Microbiol.*" -1987. -53. - №5. -P.955-957.
144. Herman, P. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR // *Food Microbiology*. -1997. -14: 103-110.
145. Hill, C. Listeriolysin S a second haemolysin with a role in the virulence of *Listeria monocytogenes* / C. Hill. // *Livro de actas do congresso: ISOPOL XVII*. - Porto, 2010. - P. 24.
146. Ho, J.L. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection in involving patients from eight Boston hospital / J.L. Ho, K.N. Shands, G. Friedland, P. Eckind , D.W. Fraser // *Arch. Intern. Med*. -1986. -146: 520-524.
147. Hughes, D.E. The disintegration of microorganisms/ D.E. Hughes, J.W.T Wimpenny, D.W. Lloyd// In: *Methods in microbiology*. V. 5B. Academic Press. Inc. New York. - 1971. – P.1-54.
148. Jacket, C. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992/ C. Jacket, R. Catimel, R. Brosch et al. // *Appl. Environ Microbiol*. -1995. -61: 123-125.

149. Jersek, B. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR/ B. Jersek, P. Gilot, M. Gubina, N. Klun, J. Mehle, E. Tcherneva, N. Rijpens, L. Herman // *J. Clin. Microbiol.* -1999. -37: 103-109.
150. Kallinger, A.H. Manual of clinical microbiology/ A.H. Kallinger, In: E.H. Lennette, E.H. Spaulding, Y.P. Tenet (ed.)// Washington. -1999.- p.135-139.
151. Kholer, S. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* / S. Kholer, M. Leimeister-Wachter, T. Chakraborty, F. Lottspeich, W. Goebel // *Infect. Immun.* -1990. -57: 55-61.
152. Laemmli, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, - c.680–685.
153. Leimeister-Wächter, M. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated / M. Leimeister-Wachter, E. Domann, T. Chakraborty // *J. Bacteriol.* -1992. Vol. 174. - P. 947-952.
154. Louri, M.J. Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511: lux AB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods/ M.J. Louri, M. Rudolf // *Appl. Environ Microbiol.* -1997. -63: 2961-2965.
155. Manzano, M., A simple and Fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat/ M. Manzano, L. Cocolin, P. Ferroni, C. Cantoni, G. Canu // *J. Sci. Food and Agric.* -1997. -74: 25-30.
156. McBride, M.E. A selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations / M.E. McBride, Girard K.F. // *J. Lab. Clin. Med.* -1960. -55: 153-157.
157. McLauchlin, J. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis/ J. McLauchlin, M.H. Greenwood, P.N. Pini // *Int. J. Food. Microbiol.* -1990. -10: 255-262.

158. Meena, M. Virulence Factors and Their Associated Genes in Microbes/ M. Meena, P. Swapnil, A. Zehra, et.al.// Elsevier. -2019. – P.181-208.
159. Milenbachs, A. A. Carbon source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* / A. A. Milenbachs, D. P. Brown, M. Moors, P. Youngman // Mol. Microbiol. - 1997.- Vol. 23.- P. 1075-1085.
160. Monden, S. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan / S. Monden, A. Okutani, H. Suzuki, H. Asakura, A. Nakama, S. Igimi, Y. Okada and T. Maruyama// Livro de actas do congresso: ISOPOL XVII. Porto, 2010.- P.73.
161. Morvan, C. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* human strains isolated since 1926 in France / C. Morvan, A. Moubareck, M. Leclercq, S. Bremont, P. Lecuit and A. Le Monnier Courvalin// Livro de actas do congresso: ISOPOL XVII. -Porto, 2010. -P.108.
162. Moura, A. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*/ A. Moura, A. Criscuolo, H. Pouseele et. al.// Academic journal/ Nature Microbiology. – 2016. – 2:16185.DDi:10.1038- 185.
163. Njoku-Ob, A. N. Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysins / A. N. Njoku-Ob, E. M. Jenkins, J. C. Njoku-Obi, J. Adams, V. Covington // J Bacteriol. 1963. - Vol. 86, №1. - P. 1-8.
164. Notermans, S. Nenzzeitliche problem in der lebens mittelmikrobiologie/ S. Notermans // Fleischwirtschaft. -1991.-71. -№6. - C.648-652.
165. Obiger, G. Verleicheude untersuchungen mit verschiedenen Nahrmedien zur bacteriologischen diagnose der Listeriose/ G. Obiger, A. Schonberg // Fleischwirtschaft. -1973. -53.-№10. -C. 1452-1456.

166. Papageorgiou, D.K. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of fetacheese/ D.K Papageorgiou, H. Marth // J. Food. Prot. -1989. -52: 8287.
167. Paterson, J. S. Flagellar antigens of organisms of the genus *Listeria* / J. S. Paterson // J. Path. Bact. 1939. - 48. - P. 25-32.
168. Paterson, J. S. The antigenic structure of organisms of the genus *Listeria* / J. S. Paterson // J. Pathol. Bacteriol. 1940. - Vol. 51. - P. 427-436.
169. Perez-Diaz, J.C. Plasmids in *Listeria* / J.C. Perez-Diaz, M.F. Vicente, F. Baquero// "Plas-mid". -1982. -8. -№2. -C. 112-118.
170. Pinner, R.W. Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation/ R.W. Pinner, A. Schuchat, B. Swaminathan et al.// JAMA. -1992. -267: 2046-2050.
171. Portnoy, D. A. Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen / D. A. Portnoy // Curr. Opin. Immunol. 1992. - Vol. 4. - P. - 20-24.
172. Renzoni, A. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive / A. Renzoni, A. Klarsfeld, S. Dramsi, P. Cossart// Infect. Immun. 1997.-Vol. 65.-P. 1515-1518.
173. Roche, S. M. Low-virulence field *Listeria monocytogenes* strains belong to four phe-notypic groups / S. M. Roche, P. Gracieux, I. Albert, P. Velge // XV International Symposium on Problems of Listeriosis. - Uppsala, Sweden, 2004.
174. Rocourt, J. Epidemiology of human listeriosis and seafoods/ J. Rocourt, C. Jacquet, A. Reilly // Int. J. Food Microbiol. 2000; 62 (3):197–209.
175. Rocourt, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification/ E.T. Ryser, E.H. Marth // New York. -1999. -P. 1-20.

176. Ryser, E.T. Effect of pH on distribution of *Listeria* Ribotypes in Corn, Hay, and Grass-silage/ E.T. Ryser, S.M. Arimi, C.W. Donnelly // *APP. ENVIR. Microbiology*. -1997.-63:3695-3697.
177. Salton, M.R. Isolation of cell walls from gram positive bacteria/ M.R. Salton, *Methods Enzymology*. – 1974. – 31 A. – P. 653 – 655/Schlegel, H.G. *Allgemeine Microbiologie*/ H.G. Schlegel// New York. -1986. – 570p.
178. Schuchat, A. Epidemiology of Human Listeriosis / A. Schuchat, B. Swaminathan, C. V. Broome // *Clin. Microbiol.* 1991. - Rev. - 4. - P. 169-183.
179. Secic, I. Non-hemolytic and hypovirulent *Listeria monocytogenes* became hemolytic and virulent after passage through mice /I. Secic, T. Lindback, L. M. Rorvik.- *Livro de actas do congresso: ISOPOL XVII*. Porto, 2010. - P. 102.
180. Seeliger, H. P. *Listeria and Law in "Listeria 1992, ISOPOZ XI"* / H. P. Seeliger // *Copenhagen*. 1992. - P. 1-6.
181. Seeliger, H. P. R. *Listeriosis* / H. P. R. Seeliger // 1961. Karger, New York. - NY.
182. Seeliger, H.P.R. A listeriosis epidemiologia jonan es epizootologica janan uj sremleleti modia / H.P.R. Seeliger, // *Egeszsegtudomany*. -1973. - V.17. -№1. -P.6-16.
183. Shultz, L. D. Cytotoxicity of rabbit blood for *Listeria monocytogenes*. / L. D. Shultz, Martin S. Wilder // *Infect. Immunity*. 1971. - Vol. 4. -P. 701-708.
184. Skalka, B. Selective diagnostic for pathogenic *Listeria* spp./ B. Skalka, J. Smola // *J. Clin. Microbiol.* -1983. -18. -№6. -C. 1432-1433.
185. Slack, Y. *Bacteria and human disease*/ Y. Slack, Y.S. Snyder// *Year Book. Medical Publishers*. – Chicago. – 1978. – 250p.

186. Smith, C.W. Demonstration of a capsular structure on *Listeria monocytogenes* / C. W. Smith, G. F. Metzger // *Pathol. Microbiol.* 1962. - Vol. 25. -P. 499-506.
187. Smith, H. Bacterial and viral inhibition and modulation of host defences / H. Smith, G. Falcone, M. Campa, G. M. Scott // Academic Press Inc. London, 1984.- P. 171-190.
188. Smola, J. Possibilities of differentiation of *Listeria* hemolysis by synergistic hemolytic reactions (CAMP reaction) // *Int. J. Food. Microbiol.* - 1989. -51: 596-599.
189. Sneath, P. H. A. *Berge's manual of Systematic bacteriology* / P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Holt J. G. Sharpe, //9th Ed.- Vol. 2.- 1986.- Williams & Wilkins. - Co. Baltimore. MD. - P. 253.
190. Sword, C.P. The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // *J. gen. Microbiol.* - 1961. - 25, № 2. - P. 241 -248.
191. Temple, M. E. Treatment of listeriosis/ M. E. Temple, M.C. Nahata // *Ann. Pharmacother.* 2000; 34 (5): 656–661.
192. Tenover, F.C. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing/ F.C. Tenover, R.D. Arbeit, R.V. Goering et al. // -1995. -33: 2233-2239.
193. Valencia Ortega, M. E. Listeriosis: an infrequent infection in patient with HIV/ M. E. Valencia Ortega, A. Enriques Crego, F. Laguna Cuesta et al. // *An.Med. Interna.* 2000; 17 (12): 649–651.
194. Vaz-quez-Boland, J. A. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants / J. A. Vaz-quez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, J. Kreft // *Clin. Microbiol.* 2001. - Rev. 14. - P. 584-640.

195. Vazquez-Boland, J. A. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread / J. A. Vazquez-Boland, C. Kocks, S. Dramsi, et al. // *Infect Immun.* 1992.- 60.- P. 219-230.
196. Welshimer, H.J. Topple and Wilson's principles of bacteriology and immunity/ H.J. Welshimer, G.S. Wilson, A.A. Miles// Baltimore. – 1974.
197. WHO. Listeriosis. Available at. [www.who-int/news-room/factsheets/detail/listeriosis](http://www.who-int/news-room/factsheets/detail/listeriosis).
198. Work, E. Cell walls/ E. Work, Y.R. Norris and D.W. Ribbons// – *Methods in microbiology* New York. Academic Press. – USA– 1971. – P. 361-418.

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1 - Общая схема исследований

Рисунок 2 – *Listeria monocytogenes* под микроскопом (мазок из суточной культуры, окраска по Граму (кратность - 400х)

Рисунок 3 – Электрофореграмма исследуемых суспензий штаммов листерий в ПААГе после УЗ – озвучивания

Рисунок 4 – Электрофореграмма полипептидов суспензии листерий, полученных воздействием детергентной смесью.

Рисунок 5 – Схема выделения аллергенов гидролизом серной кислоты

Рисунок 6 - Схема фракционирования аллергена

Рисунок 7 – Схема получения листериозного аллергена с ДДС-Na

Рисунок 8 – Электрофоретические профили полученных препаратов

## **7 ПРИЛОЖЕНИЯ**

УТВЕРЖДАЮ :  
Заместитель директора ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,  
д. б. н. Чернов А.Н.

2018 год



Акт  
об использовании листериозного аллергена

Мы нижеподписавшиеся профессор ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» д.в.н. Фаизов Т.Х., старший научный сотрудник к.б.н. Усольцев К.В., профессор Казанской ГАВМ Алимов А.М., аспирант Казанской ГАВМ, составили настоящий акт о том, что 4.06.18 по 29.06.18 в условиях лаборатории биохимии и молекулярно-генетического анализа провели опыт по определению активности листериозного аллергена, разработанного в Казанской ГАВМ, на морских свинках. В опытах использовали 20 морских свинок, в т.ч. 5 интактных, 5 вакцинированных противолостериозной вакциной из штамма «АУФ», 5 инфицированных патогенным штаммом листерий Т-71, 5 вакцинированных сальмонеллезной вакциной.

Кожную аллергическую пробу ставили на морских свинках через 1 месяц после вакцинации и заражение сублетальной дозой. Аллерген вводили внутрикожно в область спины в объеме 0,1 мл.

Результаты:

- 1) Через 3-6 часов после инъекции аллергена, заметных местных изменений не наблюдалось.
- 2) Через 24-48 часов аллергическая реакция, у всех сенсibilизированных (вакцинированных и инфицированных) животных проявлялась в виде припухлости, болезненности и увеличения диаметра кожной складки в 2 – 2,5 раза.
- 3) У интактных морских свинок спустя 12-24 часа местной реакции на введение аллергена не наблюдалось.

Заключение:

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что у сенсibilизированных листериозным антигеном морских свинок на введение аллергена проявлялась реакция гиперчувствительности замедленного типа, в виде гиперемии, отека и утолщение кожной складки. У интактных морских свинок и вакцинированных сальмонеллезной вакциной, ответной местной реакции на введение аллергена отсутствовала.

Результаты проведенных опытов свидетельствуют об активности и специфичности полученного аллергена.

Фаизов Т.Х.  
Усольцев К.В.  
Алимов А.М.  
Балясова Н.А.

УТВЕРЖДАЮ:

Ректор ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ

профессор

Р.Х. Равилов

« 12 »

03

2021 год

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

### по изготовлению и контролю листериозного аллергена

#### 1. Нарботка биомассы листерий

1.1. Бактериальную массу листерий получают культивированием на агаре Хоттингера с аминным азотом 200 мг% и добавлением 0,4% глюкозы в течении 48 часов при 37°C.

1.2. Микроскопией мазков, окрашенных по Граму, проверяют чистоту культуры.

1.3. Культуру с пластины агара смывают с 0,85% раствором хлористого натрия, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Затем биомассу отделяют путем центрифугирования при 4000 об/мин в течении 15 мин. Осадок ресуспензируют в физиологическом растворе и вновь центрифугируют. Полученный осадок используют для дальнейшей работы.

#### 2. Фракционирование аллергена

##### 2.1. Получение ацетонового порошка листерий.

Осадок биомассы листерий, полученный после центрифугирования (п.1.3), разбавляют в холодном (-20°C) ацетоне из расчета 1 г в 20 см<sup>3</sup>, тщательно перемешивают, оставляют на 15-20 мин. После этого отделяют осадок центрифугированием при 4000 об/мин в течении 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют. Осадок лиофилизируют на воздухе и получают ацетоновый порошок листерий.

## 2.2. Выделение и очистка аллергена

Ацетоновый порошок листерий (п.2.1) разбавляют в 1%-ном водном растворе додецилсульфата натрия из расчета 100 мг в 10 см<sup>3</sup>, добавляют 2-3 капли толуола, 2 часа выдерживают при 20-22 °С, перемешивая магнитной мешалкой. Затем оставляют в холодильнике при 4..5°C в течении 16-18 часов. После этого суспензию центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин. Осадок (нерасщепленные и нерастворённые клетки) удаляют. К надосадочной жидкости добавляют 2 объема 96% этилового спирта и оставляют на 15...18 часов при температуре + 4...5°C. Затем центрифугируют при 10000 об/мин в течение 15 мин при температуре + 4...5°C. Надосадочную жидкость удаляют. Осадок разводят в 10 мл дистиллированной воды, переносят в диализный мешок и подвергают диализу против дистиллированной воде в течении 3-4 часов. Затем полученный препарат лиофилизируют в вакуум-сушильном шкафу и используют в качестве исходного материала для приготовления аллергена.

## 3. Приготовление листериозного аллергена

3.1 Разведение аллергенной фракции. Полученный препарат (п. 2.2) растворяют в фосфатном буфере рН 7,4 из расчета 100 мкг препарата в 1 мл, добавляют тритон Х-100 до конечной концентрации 1:20000 и стерилизуют фильтрацией через капроновый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

3.2 Расфасовка аллергена. Аллерген (п.3.1) расфасовывают в стерильные ампулы по 1 мл и ампулы запаивают. Ампулы помещают в картонные коробки по 10 шт.

3.3 Контроль стерильности аллергена. Стерильность проверяют посевом на МПА, МПБ, среду Сабуро и Китта-Тароцци по 0,2 мл препарата. Посевы инкубируют в течении 4 суток. Роста микроорганизмов не должно быть.

#### **4. Условия хранения листериозного аллергена**

4.1. Аллерген хранят в холодильнике при + 4..5°C.

4.2. Срок годности препарата составляет 1 год.

Разработчики:

д.в.н., профессор кафедры биохимии, физики и математики, Алимов А.М.,

аспирантка кафедры биохимии, физики и математики Асхатова Н.А.

Одобрено на заседании НТС Казанской ГАВМ Протокол №1 от 11.03.2021г.

УТВЕРЖДАЮ:

Начальник Главного Управления  
ветеринарии Кабинета Министров  
Республики Татарстан

  
А.Г. Хисамутдинов

« 15 » 03 2021 год



**ВРЕМЕННЫЕ ВЕТЕРИНАРНЫЕ ПРАВИЛА**  
по применению листериозного аллергена  
для диагностики листериоза и листерионосительства  
(в порядке апробации)

1. Общие сведения

Листериозный аллерген, полученный из микробной массы листерий, представляет из себя прозрачную жидкость. Его применяют для диагностики листериоза и выявления животных - листерионосителей.

2. Форма выпуска и хранение

Аллерген выпускают в ампулах по 1 мл. Ампулы расфасовывают в картонные коробки по 10 шт. Ампулы с аллергеном хранят при температуре + 4..5 °С.

3. Применение

Ампулы с аллергеном вскрывают и аллерген набирают в шприц с тонкой иглой. Препарат вводят строго внутривенно в дозе 0,1-0,2 мл. Предварительно место инъекции тщательно выстригают и обрабатывают 70%-ным спиртом. После введения аллергена должна появиться небольшая припухлость в виде «лимонной корочки», которая исчезает через 3-4 часа.

#### 4. Оценка аллергической пробы

При оценке результата аллергической пробы определяют толщину кожной складки до и после введения аллергена кутиметром, а также учитывают размер припухлости и признаки воспалительной реакции. Оценку аллергической реакции проводят через 24 и 48 часов после инъекции аллергена.

Положительная реакция характеризуется появлением на месте инъекции аллергена припухлости и утолщением конечной складки в 1,5 – 2 раза и более через 24 часа, которая сохраняется через 48 часов. Затем местная воспалительная реакция постепенно исчезает.

Временные ветеринарные правила разработаны сотрудниками ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ аспирантом кафедры биохимии, физики и математики Асхатовой Н.А., профессор кафедры биохимии, физики и математики, Алимовым А.М. Правила утверждены на научно-техническом совете ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, протокол №1 от 11.03.2021г.

Для производственных испытаний, производство листериозного аллергена осуществляет: федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана», 420029, РТ, г. Казань, ул.Сиб.тракт,35. Тел.: 273-96-17.