

На правах рукописи

Хаптанова Наталья Маркеловна

**РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИСТЕРИЙ И ТЕХНОЛОГИИ
ПРОИЗВОДСТВА СЫВОРОТКИ ЛИСТЕРИОЗНОЙ
АГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2023

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Балахонов Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор

Официальные оппоненты:

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук, Управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный эксперт, г. Москва

Маркова Юлия Александровна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория растительно-микробных взаимодействий, заведующая, г. Иркутск

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ростов-на-Дону

Защита состоится «___» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г. о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Листерия – инфекционное сапрозоонозное заболевание человека и животных, вызываемое патогенными видами листерий, характеризующееся множеством источников и резервуаров инфекции, разнообразием путей и факторов передачи возбудителя, полиморфизмом клинических проявлений, высокой летальностью новорожденных и лиц с иммунодефицитом (Джейн Д.М. и др., 2011; Карнеева Ж.Н. и др., 2016; Vissing N.H. et al., 2019; Massacesi M. et al., 2019).

В Российской Федерации заболеваемость листериозом людей официально регистрируется с 1992 г. В период 2005–2017 гг. уровень заболеваемости колебался от 0,02 до 0,05 на 100 тысяч населения (Тартаковский И.С., 2000; Олещенко Е.П. и др., 2012; Некрасова Ю.Э. и др., 2018; Еремушкина Я.М. и др., 2020).

В лабораторной диагностике листериоза остаются востребованными серологические методы исследования. Одним из специфичных, надежных и доступных серологических методов обнаружения возбудителя листериоза является реакция агглютинации (РА), для постановки которой необходима листериозная агглютинирующая сыворотка (Тартаковский И.С. и др., 2002; Омарова С.М. и др., 2007; Мазенюк И.Н. и др., 2014; Марданлы С.Г., 2014; Нечаев В.Н. и др., 2015).

Одним из основных этапов технологического процесса производства сыворотки листериозной агглютинирующей является получение биомассы листерий и подбор схемы иммунизации животных-продуцентов. Для выделения, культивирования, обогащения и идентификации листерий мировые и отечественные производители выпускают ряд питательных сред, некоторые из них содержат ингибиторы роста микроорганизмов. При этом коммерческие питательные среды для культивирования не обеспечивают получение биомассы *Listeria monocytogenes*. При конструировании питательных сред возникают проблемы доступности, экономичности и качества исходного сырья (Шепелин А.П., 2013). Исходя из этого, для микробиологических сред предлагаются разнообразные источники белка. Мясные основы уступают место рыбе и продуктам её переработки (килька каспийская, ставрида, хек, сардина и др.). В качестве источника белка в производстве питательных сред возможно использование панкреатических рыбных гидролизатов (Поляк М.С. и др., 2008; Номоконова Т.Ю. и др., 2009). Специалистами ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора ведутся разработки по получению питательных основ, в том числе и из рыбной продукции – сороги (лат. *Rutilus rutilus*) (Кузнецов В.И. и др., 2006; Татарникова О.Г. и др., 2006; Кузнецов В.И. и др., 2008). Сорога, обитающая в прибрежной соровой системе бассейна озера Байкал, является рыбой пониженной товарной ценности и использование ее в качестве основ питательных сред экономически целесообразно (Мягков Н.А., 1994; Пронин Н.М. и др., 2007; Ключникова В.Н. и др., 2014).

В связи с этим, разработка технологии получения сыворотки листериозной агглютинирующей с использованием сконструированной

питательной среды для культивирования *L. monocytogenes* является актуальной задачей в лабораторной диагностике листериоза.

Степень разработанности темы исследования

Исследованиями по получению листериозных кроличьих агглютинирующих сывороток в СССР и РФ занимались Михайлова Н.А. (1959), Буренкова Л.А. (1962), Огнева Н.С. (1963), Шлыгина К.Н. (1963), Бакулов И.А., Котляров В.М., Васильев Д.А. (1968), Егшатын Т.И. (2002), Алиева Е.В. (2008) и др., в Европе и США – Seeliger H.P. (1961), Metzger J.F., Smith C.D. (1962) и др. (Бакулов И.А. и др., 2016). В 2000-х гг. типовые поливалентные и моновалентные (1 и 2 серотипов) листериозные сыворотки выпускали в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Покров) (Зайцева Е.А. и др., 2014). Несмотря на имеющиеся технологические разработки, в настоящее время серийного производства этих препаратов в нашей стране нет.

В РФ для лабораторной диагностики листериоза используют латексную тест-систему *Listeria monocytogenes* производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (п. Оболенск) (Регистрационный номер медицинского изделия РЗН 2013/1304 от 06.12.2013 г.).

На момент проведения настоящих исследований в Государственном реестре медицинских изделий РФ зарегистрированные сыворотки листериозные агглютинирующие отсутствуют.

На отечественном рынке тремя производителями: ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), ООО Научно-исследовательский центр фармакотерапии (г. Санкт-Петербург) и НПО «Питательные среды» (г. Махачкала) представлены питательные среды для обогащения, выделения и идентификации листерий, которые в своем составе содержат селективные добавки, замедляющие рост культивируемого штамма. Питательные среды для культивирования *L. monocytogenes* с целью получения биомассы отсутствуют.

Цель работы – разработать состав питательной среды для культивирования листерий на основе панкреатического гидролизата сороги и оптимизировать технологию производства сыворотки листериозной для реакции агглютинации.

Задачи исследования:

1. Подобрать доступные источники белкового сырья из рыбы и морепродукта для получения панкреатических гидролизатов, изучить их ростовые свойства.

2. Сконструировать питательную среду на основе полученных панкреатических гидролизатов для культивирования *L. monocytogenes* 766 при производстве сыворотки листериозной агглютинирующей.

3. Оптимизировать схему иммунизации кроликов-продуцентов для получения специфических стабильных антител.

4. Подобрать альтернативные стабилизаторы для сохранения основных качественных показателей и диагностических свойств сыворотки листериозной агглютинирующей, определить срок ее годности.

5. Разработать технологию производства сыворотки листериозной агглютинирующей.

Научная новизна

Впервые, с использованием микробиологических, биохимических методов и ЯМР-спектроскопии, показано, что панкреатический гидролизат сороги является полноценной питательной основой для культивирования листерий при конструировании питательной среды. Панкреатический гидролизат сороги содержит аминокислоты (аланин, валин, треонин, аргинин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, глицин, гистидин, тирозин, триптофан), которые удовлетворяют питательные потребности листериозного микроба.

Впервые, на основе панкреатического гидролизата сороги, обитающей в прибрежной соровой системе бассейна озера Байкал, сконструирована питательная среда для получения биомассы *L. monocytogenes* 766, используемая в производстве сыворотки листериозной агглютинирующей.

Впервые разработана оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов, позволяющая в короткие сроки (21–22 дня) получить гипериммунную высокоспецифичную сыворотку листериозную агглютинирующую без адсорбции гетерологичных антител.

Впервые, на основе экспериментальных исследований, для стабилизации сыворотки листериозной агглютинирующей подобрана эффективная комбинация стабилизаторов и их концентрации (3 % сахара и 1 % тиосульфат натрия), позволяющие сохранять препарат в течение 5 лет с титрами антител (1:400) к *L. monocytogenes*.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования

1. Разработана нормативно-техническая документация для производства сыворотки листериозной агглютинирующей: технические условия (ТУ 21.20.23-015-01898090-2018), промышленный регламент (ПР 01898090-015-17), утвержденные директором ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора от 04.05.2017 г., протокол № 10 и инструкция по применению медицинского изделия (Приложения 1 и 2).

2. Проведены технические испытания сыворотки листериозной агглютинирующей в ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники» Росздравнадзора, получен протокол технических испытаний от 30.06.2017 г. № П-15-230 и акт оценки результатов технических испытаний медицинского изделия от 30.06.2017 г. № П-15-230 (Приложения 3 и 4).

3. Проведены испытания по чувствительности и специфичности сыворотки листериозной агглютинирующей (серия № 44, 03.2018 г.) с использованием изолятов *Listeria* spp., выделенных в РФ в период 2016–2019 гг. на территории административного центра (г. Москва) и семи субъектов РФ (Московская, Ярославская, Тверская, Орловская, Белгородская, Ростовская и Вологодская области) из объектов окружающей среды (сточные воды, мелкие млекопитающие), пищевых продуктов (мясные и рыбные полуфабрикаты), биоматериала от больных листериозом (околоплодные воды, ликвор больного

менингитом) на базе Референс-центра по мониторингу за листериозом (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), получены от 29.03.2019 г. протокол и акт внедрения, утвержденные директором ФБУН ГНЦ ПМБ (Приложения 5 и 6).

4. Проведено клиническое испытание МИ «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации» в ФКУЗ Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (г. Саратов), получены от 17.09.2021 г. протокол № 31 клинических испытаний МИ для диагностики *in vitro* и акт № 31 оценки результатов клинических испытаний медицинского изделия для диагностики *in vitro* (Приложения 7 и 8).

5. Разработан промышленный регламент (ПР 01898090-020-19) по производству питательной среды для культивирования листерий, утвержденный директором ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора от 14.11.2019 г. (Приложение 9).

6. Получено положительное решение о выдаче патента на изобретение «Питательная среда для культивирования листерий» заявка от 12.01.2015 г. № 2015100675/10(000966).

7. Получено свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020621065 «Питательные среды для культивирования, выделения и идентификации листерий» от 25.06.2020 г. (Приложение 10).

8. Получен патент на изобретение «Питательная среда для получения биомассы листерий» от 21.03.2022 г. RU 2767782 C1 (Приложение 11).

9. Материалы диссертационной работы включены в курс лекций по микробиологии и лабораторной диагностике листериоза в учебном процессе дополнительного профессионального образования на базе отдела подготовки и усовершенствования специалистов при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 14.02.2022 г.).

10. Разработаны Методические рекомендации по верификации статистической достоверности результатов оценки показателей эффективности *in vitro* диагностики, утвержденные директором ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол от 26.10.2021 г. № 5.

Методология исследования

Основой методологии в диссертационной работе явилось изучение микробиологических и иммунологических подходов в производстве медицинских изделий. Использованы методы лабораторных исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования физико-химических и биологических свойств панкреатических гидролизатов из рыбного сырья (сельдь, минтай, сорога) и морепродукта (кальмар) показывают, что панкреатический гидролизат сороги является полноценной белковой основой питательной среды для культивирования *L. monocytogenes* 766.

2. Схема трехкратной иммунизации кроликов-продуцентов комбинированным (внутривенное и внутримышечное) введением

корпускулярного иммуногена *L. monocytogenes* 766, стимулирует выработку стабильных специфических антител.

3. Стабилизирующее действие на сыворотку листериозную оказывают сахара и тиосульфат натрия в концентрациях 3 % и 1 %, соответственно, с сохранением биологической активности (чувствительность и специфичность) сыворотки листериозной агглютинирующей в течение пяти лет.

4. Разработана технология производства стабильной гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей без адсорбции гетерологичных антител.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность результатов работы подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований и их статистической обработкой. Все исследования проведены в испытательном лабораторном центре ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.517955), с использованием аттестованного оборудования и контрольно-измерительных приборов, прошедших метрологическую поверку.

Материалы диссертационной работы представлены на II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2019); 23th International scientific conference «Current issues on zoonotic diseases» (Mongolia, 2019); научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за особо опасными и природно-очаговыми инфекционными болезнями» (Иркутск, 2019); XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Екатеринбург, 2021); XV Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (Иркутск, 2021); 24th International scientific conference «Current issues on zoonotic diseases» (Mongolia, 2021); VI Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология в интересах экологии и экономики России» (Улан-Удэ, 2022), а также на научных конференциях ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Иркутск, 2018–2019).

Работа выполнялась в рамках плановой научной темы 011-2-16 «Технология получения питательной среды для культивирования листерий и получение агглютинирующей листериозной сыворотки» № ГР АААА-Б19-219022890019-5 (2016–2017 гг.).

Публикации. Основные результаты исследования представлены в 18 научных работах, четыре из них в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов на соискание ученой степени кандидата наук.

Объём и структура работы. Диссертация изложена на 157 страницах, иллюстрирована 11 рисунками, 23 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы исследования», двух глав собственных исследований, заключения, выводов, 11 приложений, списка использованной литературы, включающего 237 источников, в том числе 94 зарубежных.

Личный вклад соискателя

Автором проведен анализ литературных источников по теме исследования, определена цель работы, осуществлен выбор путей решения задач. Основная часть экспериментальной работы (бактериологические, физико-химические и серологические исследования) выполнена автором самостоятельно. Диссертант совместно с сотрудниками научно-производственного отдела института принимала участие в подготовке нормативно-технической документации на питательную среду для культивирования листерий и сыворотку листериозную агглютинирующую.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА

В главе приведены сведения об особенностях биологических свойств *L. monocytogenes* и ее антигенной структуре, описаны научные основы производства листериозных агглютинирующих сывороток, схемы иммунизации кроликов-продуцентов, способы стабилизации сыворотки. Охарактеризованы питательные потребности листериозного микроба.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Белковое сырье для приготовления панкреатических гидролизатов (ПГ). В качестве исходного сырья использовали тихоокеанскую сельдь (*Clupea pallasii*), минтай (*Gadus chalcogrammus*), сорогу (*Rutilus rutilus*) и кальмара европейского (*Loligo vulgaris*). В качестве источника протеолитических ферментов использовали поджелудочную железу крупного рогатого скота (Дятлов И.А., 2012).

Штаммы. В работе использовали 56 штаммов ПБА III–IV групп патогенности, в том числе 32 штамма *L. monocytogenes*, 18 штаммов *Listeria* spp. и 6 гетерологичных штаммов. Для получения корпускулярного антигена (далее иммуноген) и при конструировании питательной среды для культивирования листерий использован референс-штамм *L. monocytogenes* 766, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.

Питательные среды. В период с 2009 по 2022 гг. произведено 4 экспериментальных серии сухой питательной среды для культивирования листерий в количестве 2 кг. В качестве контрольных сред использовали мясо-пептонный агар (МПА) с 1 % глюкозой (протокол аттестации № 1 от 14.11.2019 г., ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) и питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск).

Лабораторные животные. В экспериментах использовали 455 кроликов породы *Chinchilla* ($2,75 \pm 0,5$ кг) из лаборатории подопытных животных института. Протоколы экспериментов на животных одобрены Комитетом по биоэтике (Протокол № 5 от 29.11.2022 г.).

Сыворотка листериозная агглютинирующая. В период 2009–2022 гг. получено 10 экспериментально-производственных серий сыворотки листериозной агглютинирующей (в объеме 7,52 л).

Физико-химические методы. Для изучения экспериментальных питательных сред использовали семь физико-химических параметров: внешний вид, растворимость, кислотность (pH), потери в массе при высушивании, содержание аминного азота и прочность студня агаровых сред по Валенту согласно требованиям МУК 4.2.2316-08.

Бактериологические методы. Определение биологических свойств (показатель прорастания, чувствительность и эффективность среды; скорость роста, культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства микроорганизма) экспериментальной питательной среды для культивирования листерий проводили согласно требованиям МУК 4.2.2316-08.

Биологический метод. Иммунизацию проводили с применением иммуногена, полученного из биомассы *L. monocytogenes* 766, инаktivированной кипячением при 100 °C в течение 1 ч. Кроликам-продуцентам неоднократно вводили иммуноген внутривенно и внутримышечно.

Серологические методы. Для определения чувствительности и специфичности экспериментальной сыворотки листериозной агглютинирующей использовали методы ориентировочной (ОРА) и развернутой (РРА) реакций агглютинации со штаммами *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. и гетерологичными микроорганизмами.

Протеометрический метод. Видовая принадлежность *L. monocytogenes* 766 подтверждена MALDI-TOF масс-спектрометрическим анализом с использованием расширенной базы MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, США).

Спектроскопический метод (ЯМР-спектроскопия). Качественное определение аминокислотного состава сухих ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара проводили методом ЯМР-спектроскопии совместно с ФГБУН Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН.

Статистический метод. Полученные результаты обработаны статистическими методами с определением средней величины (M) и ошибки средней арифметической (m) с помощью программы Microsoft Excel 2016 (Microsoft). Для переменных, имеющих распределение близкое к нормальному, применяли критерий параметрической статистики Стьюдента при $p < 0,05$. При оценке антигенных свойств сыворотки листериозной титры антител выражали в средних арифметических величинах по Е.В. Монцевичюте-Эрингене (1964), а средний геометрический показатель титра антител – по методу Е.П. Тамбовцева (1969).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование питательной среды для культивирования листерий

Динамику ферментативного гидролиза наблюдали по нарастанию аминного азота (Рисунок 1). Значительное накопление аминного азота с темпом прироста в среднем на 27,3 % наблюдали во всех полученных ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара в первые 6 сут (в среднем до $547,5 \pm 27,5$ мг%). Дальнейшее увеличение продолжительности гидролиза с 7 по 13 сут не привело к приросту содержания аминного азота (в среднем на 5,2 %), что доказывает нецелесообразность продолжения ферментации ПГ более 6 сут. Значения pH исследуемых питательных основ составляли от 7,13 до 7,68.

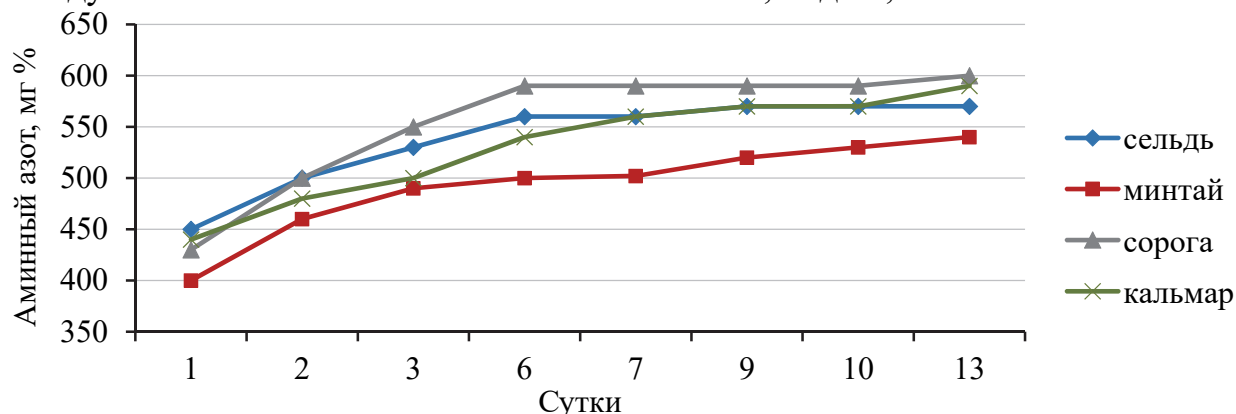


Рисунок 1 – Динамика накопления аминного азота в панкреатических гидролизатах сельди, минтая, сороги и кальмара, мг%

В качественном составе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара методом ЯМР-спектроскопии определено содержание 12 свободных аминокислот – аланин, валин, треонин, аргинин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, глицин, в незначительных количествах гистидин, тирозин и триптофан.

Сконструированы четыре варианта экспериментальных питательных сред на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара – варианты № 1, 2, 3 и 4, соответственно. В качестве контроля использовали МПА с 1 % глюкозой (Таблица 1).

Таблица 1 – Состав экспериментальных питательных сред на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара

№ п/п	Состав питательной среды	Концентрация, г/л			
		Вариант № 1 ПГ сельди	Вариант № 2 ПГ минтая	Вариант № 3 ПГ сороги	Вариант № 4 ПГ кальмара
1	ПГ	21,0	21,0	21,0	21,0
2	Натрия хлорид (NaCl)	3,0			
3	Натрия карбонат (Na ₂ CO ₃)	0,7			
4	Тиамин (витамин B1)	0,05			
5	Глюкоза	5,0			
6	Агар микробиологический	9,0			

Отчетливо видимый «росинчатый» рост штамма *L. monocytogenes* 766 просматривали через 18 ч инкубации только на питательных средах на основе ПГ сельди и сороги, у других двух сред с ПГ минтая и кальмара рост определен через 24 ч. В средах с ПГ сельди (вариант № 1) и сороги (вариант № 3) через

24 ч инкубации при температуре 37 ± 1 °С отмечали типичный рост колоний в S-форме тест-штамма *L. monocytogenes* 766, достаточный для визуального подсчета колоний ($d = 1,0\text{--}1,5$ мм). Питательные среды с ПГ минтая (вариант № 2) и кальмара (вариант № 4) обеспечивали типичный рост культуры только через 48 ч инкубации.

При микроскопии мазка просматриваются короткие грамположительные палочки с закругленными концами во всех вариантах сред.

По биохимическим свойствам в отношении основных углеводов показано, что тест-штамм *L. monocytogenes* 766, инкубированный на экспериментальных средах, одинаково ферментировал рамнозу и не разлагал маннит и ксилозу. При изучении серологических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766 получен положительный результат в ОРА – 1:100 на 4 креста с сывороткой листериозной агглютинирующей (серия 43).

По прорастанию тест-штамма *L. monocytogenes* 766 из разведения 10^{-6} при культивировании в течение 48 ч высокие результаты показала питательная среда с ПГ сороги в варианте № 3 ($112,0 \pm 1,6$ %) в сравнении со средами на основе ПГ сельди, минтая и кальмара (варианты № 1, 2 и 4).

При изучении чувствительности на экспериментальных средах с добавлением взятых в опыт четырех питательных основ, количество выросших колоний штамма *L. monocytogenes* 766 через 48 ч инкубации при температуре 37 ± 1 °С отличались между собой незначительно, за исключением питательной среды с ПГ сороги (вариант № 3). Также наблюдали увеличение размера колоний тест-штамма *L. monocytogenes* 766 до 4,0 мм на питательной среде варианта № 3, по сравнению с другими средами. На контрольной среде МПА с 1 % глюкозой наблюдали «росинчатый» рост через 24 ч культивирования тест-штамма *L. monocytogenes* 766, через 48 ч размер колоний достигал 1,0 мм.

Отсутствие диссоциации (0 %) тест-штамма *L. monocytogenes* 766 при культивировании на испытуемых средах в четырех вариантах показало стабильность сохранения его основных биологических свойств.

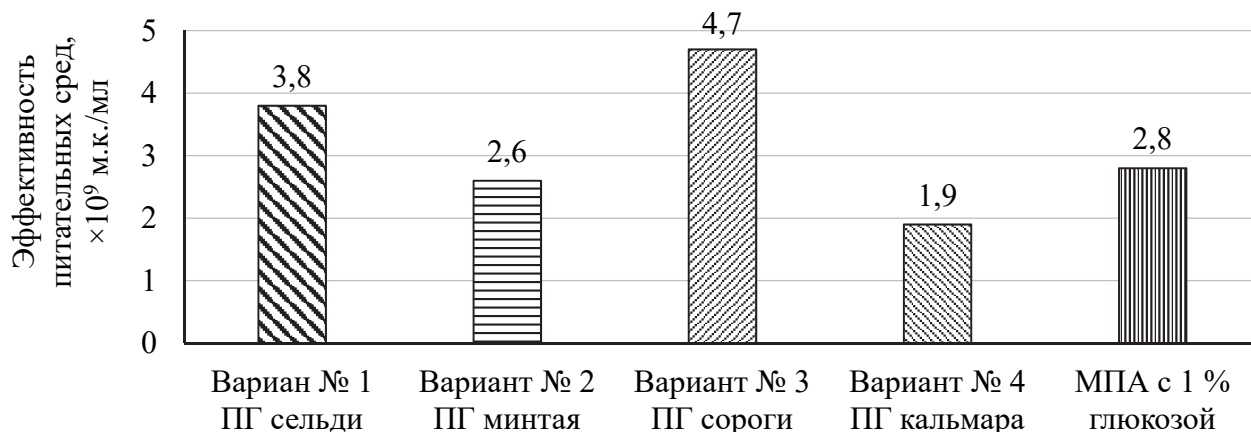


Рисунок 2 – Эффективность экспериментальных питательных сред на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара

Эффективность контрольной питательной среды МПА с 1 % глюкозой составляет $2,8 \times 10^9$ м.к./мл. Наибольшая эффективность питательной среды определена в вариантах № 3 – $4,7 \times 10^9$ м.к./мл и № 1 – $3,8 \times 10^9$ м.к./мл,

что в среднем выше контроля на 67,9 % и на 48,5 %, соответственно. Наименьший выход микробных клеток *L. monocytogenes* 766 с 1 мл питательных сред наблюдали в вариантах № 2 – $2,6 \times 10^9$ м.к./мл и № 4 – $1,9 \times 10^9$ м.к./мл (Рисунок 2).

Таким образом, сравнительная оценка специфической активности экспериментальных вариантов питательных сред на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара показала, что питательной основой, перспективной для конструирования экспериментальной среды для культивирования листерий, является ПГ сороги. По стабильности основных биологических свойств культивируемого тест-штамма *L. monocytogenes* 766, прорастанию, чувствительности, скорости роста и эффективности питательная среда на основе ПГ сороги превосходит остальные варианты. Кроме того, сорога, как белковая основа для получения ПГ, представляет интерес для Иркутского научно-исследовательского противочумного института ввиду относительно низкой стоимости и доступной сырьевой базы, расположенной в водной системе бассейна озера Байкал, южной части Восточной Сибири и по береговой линии в Иркутской области (Слюдянский, Иркутский, Ольхонский, Качугский районы) и Республике Бурятия (Кабанский, Прибайкальский, Баргузинский, Северо-Байкальский районы).

На основании экспериментальных и литературных данных разработаны три версии питательных сред с различным составом и соотношением компонентов: гидролизат отходов производства мясной воды (ГОПМВ) – версии № 1 и 2 и ПГ сороги + ГОПМВ – версия № 3 (Таблица 2). В качестве контроля – МПА с 1 % глюкозой.

Таблица 2 – Состав экспериментальных питательных сред с ПГ сороги и ГОПМВ

Состав питательной среды	Концентрация, г/л			
	Версия № 1	Версия № 2	Версия № 3	МПА с 1 % глюкозой
ПГ сороги	–	–	11,00	–
ГОПМВ	21,00	21,00	9,00	–
Пептон ферментативный	–	–	–	10,00
Мясная вода, л	–	–	–	1,00
Натрия хлорид (NaCl)	3,50	3,00	3,00	3,00
Натрия гидрокарбонат (NaHCO ₃)	–	0,65	–	–
Натрия карбонат (Na ₂ CO ₃)	0,68	–	0,65	–
Тиамин (витамин B1)	0,06	0,05	0,05	–
Глюкоза	5,00	5,00	5,00	10,00
Агар микробиологический	9,00	9,00	9,00	11,00

Отчетливо видимый рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766 на питательных средах версий № 1 и № 3 наблюдали через 24 ч инкубации, диаметр колоний достигал от 1,5 до 4,0 мм, соответственно. В это время на питательных средах версии № 2 и МПА с 1 % глюкозой просматривали замедленный «росинчатый» рост. Через 48 ч на всех засеянных чашках сформировались типичные колонии *L. monocytogenes* 766; в мазках – короткие грамположительные палочки с закругленными концами.

При изучении серологических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766, инкубированного на трех версиях питательных сред и контроле, получены положительные результаты в ОРА – 1:100 на 4 креста с сывороткой

листериозной агглютинирующей (серия 43). Тест-штамм *L. monocytogenes* 766 ферментировал рамнозу, не утилизировал маннит и ксилозу, что соответствует основным биохимическим свойствам листерий.

Наилучшие результаты прорастания тест-штамма *L. monocytogenes* 766 ($131,4 \pm 1,7 \%$) и чувствительности ($8,7 \pm 0,6$ КОЕ) определены на среде версии № 3, приготовленной на основе ПГ сороги, что в среднем выше в 1,3 раза этих же показателей на средах версий № 1 и № 2. Количество колоний тест-штамма *L. monocytogenes* 766, выросших из разведения 10^{-6} через 48 ч культивирования составило в среднем $67,1 \pm 5,7$ КОЕ, что на 14,0 % превысило значение контроля – МПА с 1 % глюкозой ($p < 0,05$). Диаметр колоний *L. monocytogenes* 766 достигал 4 мм, что в 4 раза больше, чем на контрольной среде ($p < 0,05$).

Эффективность контрольной среды МПА с 1 % глюкозой составляла $2,7 \times 10^9$ м.к./мл. Наибольший показатель установлен в питательной среде версии № 3 на основе ПГ сороги – $5,2 \times 10^9$ м.к./мл, что в среднем выше на 38,5 % сравнению с версиями № 1 – $3,4 \times 10^9$ м.к./мл и № 2 – $3,0 \times 10^9$ м.к./мл (Рисунок 3).

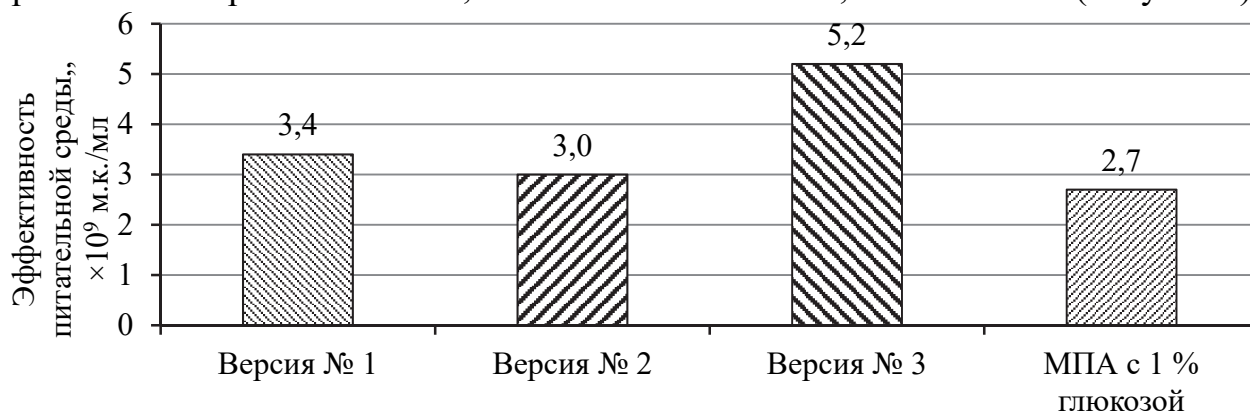


Рисунок 3 – Эффективность сконструированных питательных сред

Таким образом, сравнительная оценка специфической активности сконструированных питательных сред показала, что питательная среда версии № 3 на основе панкреатических гидролизатов сороги и отходов производства мясной воды перспективна по показателям стабильности основных биологических свойств культивируемого тест-штамма *L. monocytogenes* 766, прорастания, чувствительности, скорости роста и эффективности. Питательная среда обеспечивает получение биомассы *L. monocytogenes* 766 через 24 ч инкубации в S-форме с типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Далее обозначена как питательная среда для культивирования листерий (СКЛ).

Физико-химические показатели СКЛ: однородный мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-коричневого цвета; pH – $7,40 \pm 0,02$; аминный азот – $4,83 \pm 0,07 \%$; прочность студня среды – $531,00 \pm 13,66$ г; растворимость – 3 мин; прозрачность – легкая опалесценция; потеря в массе при высушивании – $3,75 \pm 0,05 \%$. По биологическим показателям качества среда СКЛ обеспечивает типичный рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766, диаметр колоний до $3,0 \pm 0,5$ мм.

Установлено, что питательная среда СКЛ сохраняет культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства производственного штамма тест-штамма *L. monocytogenes* 766 в течение 12 мес.

Разработка технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей

Получен инактивированный корпускулярный антиген (иммуноген) из биомассы *L. monocytogenes* 766, выращенной на питательной среде СКЛ. Иммуноген применяли при иммунизации кроликов-продуцентов в производстве сыворотки листериозной агглютинирующей. Результаты проверки специфической стерильности листериозного иммуногена показали отсутствие роста штамма *L. monocytogenes* 766. Определили химический состав иммуногена, который содержал, мг/мл: белок – $5,20 \pm 0,13$, углеводы – $1,11 \pm 0,01$ и нуклеиновые кислоты – $0,080 \pm 0,001$.

Для получения сыворотки листериозной проводили иммунизацию кроликов по двум схемам: с применением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) (Sigma-Aldrich, США) и без ПАФ (Таблица 3).

Таблица 3 – Схемы иммунизации кроликов-продуцентов

Первая схема иммунизации кроликов					
Время, дни	Способ введения	Доза ПАФ, мл	Доза иммуногена, мл	Доза сыворотки, мл	Титр антител в РРА
I цикл иммунизации					
1	В обе подушечки задних лап	0,6	—	—	—
8	Каждый задний подколенный лимфатический узел	0,5	0,2 (1,0 млрд. м.к.)	—	—
	в/м	—	0,2 (1,0 млрд. м.к.)	—	—
15	В обе подушечки передних лап	0,5	0,2 (2,4 млрд. м.к.)	—	—
	в/м	—	0,2 (2,4 млрд. м.к.)	—	—
22	Забор крови, определение титра антител				1:800
II цикл иммунизации					
37	в/в	—	1,0 (3,0 млрд. м.к.)	1,0	—
	в/м	0,5	1,0 (3,0 млрд. м.к.)	—	—
42	в/в	—	1,0 (5,0 млрд. м.к.)	1,0	—
	в/м	0,5	1,0 (5,0 млрд. м.к.)	—	—
47	в/в	—	1,0 (7,0 млрд. м.к.)	1,0	—
	в/м	0,5	1,0 (7,0 млрд. м.к.)	—	—
54	Забор крови, определение титра антител				1:3200
55	Получение сыворотки листериозной				
Вторая схема иммунизации кроликов					
Время, дни	Способ введения	Доза иммуногена, Мл		Титр антител в РРА	
1	в/в	1,0 (6,0 млрд. м.к.)		—	
	в/м	1,0 (500 млн. м.к.)		—	
4	в/в	1,0 (16,0 млрд. м.к.)		—	
	в/м	1,0 (500 млн. м.к.)		—	
7	в/в	1,0 (25,0 млрд. м.к.)		—	
	в/м	1,0 (500 млн. м.к.)		—	
15	Забор крови, определение титра антител			1:800	
21	Забор крови, определение титра антител			1:1600	
22	Получение сыворотки листериозной				

Примечание: в/м – внутримышечно, в/в – внутривенно

По первой схеме перед иммунизацией кроликам-продуцентам вводили ПАФ, далее на 8 день – смесь иммуногена с ПАФ и такую же дозу внутримышечно без ПАФ. На 15 день – вторая инъекция смесью иммуногена с ПАФ и такую же дозу внутримышечно без ПАФ. На 22 день определяли титр антител в сыворотке. На 37 день проводили II цикл иммунизации, который предусматривал трехкратное внутривенное введение комплекса антиген-антитело (АГ-АТ). Для получения комплекса АГ-АТ у животных забирали кровь в количестве 12–15 мл. Сыворотку крови разливали по 1,0 мл в три стерильные пробирки и в каждую вносили по 3,0, 5,0 и 7,0 млрд. м.к./мл иммуногена, соответственно. Подготовленный стерильный комплекс АГ-АТ вводили внутривенно этому же кролику, от которого получена сыворотка. Одновременно каждому животному внутримышечно вводили смесь иммуногена в вышеуказанных дозах с ПАФ. На 54 день в сыворотке крови кроликов определяли титры антител в РРА (Рисунок 4). Далее проводили процедуру кровопускания у кроликов.

Вторая схема иммунизации кроликов-продуцентов включала трёхкратное введение иммуногена внутривенно в возрастающих концентрациях – 6,0, 16,0 и 25,0 млрд. м.к./мл и внутримышечно – 500 млн. м.к./мл, с интервалом в три дня. На 15 день от начала иммунизации проводили пробный забор крови у животных для определения титра антител сыворотки в РРА. На 21 день забирали кровь и определяли титр антител сыворотки в РРА (1:1600) (Рисунок 4). После получения результатов, проводили процедуру кровопускания у кроликов.



Рисунок 4 – Изменение титра антител в развернутой реакции агглютинации в сыворотке крови кроликов, иммунизированных с применением ПАФ и без ПАФ

Из двух схем иммунизации кроликов-продуцентов выбрана вторая схема с применением трехкратного комбинированного введения листериозного иммуногена внутривенным и внутримышечным способами. В первой схеме иммунизации для повышения иммуногенности предусматривали полный адъювант Фрейнда, через 22 дня после начала иммунизации в РРА титры антител составили 1:800. Иммунизация по первой схеме длительна и трудоемка, при общей продолжительности в 55 дней титры антител сыворотки листериозной возрастают до 1:3200 в РРА.

Сыворотка листериозная агглютинирующая полученная по второй схеме иммунизации не требует адсорбции гетерологичных антител

и видоспецифична. При исследовании сыворотки с близкородственными и гетерологичными штаммами (*L. ivanovii* 97к-88, *L. innocua* 6а 304004 *E. coli* ATCC 25922, *St. aureus* ATCC 6538, *Sal. Enteritidis* Gartneri, *Sal. Typhimurium* 21, *Sh. Flexneri* 170, *Y. enterocolitica* O3 628/1) агглютинация в ОРА и РРА отсутствовала.

Таким образом, подобрана оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов с использованием трехкратного введения листериозного иммуногена, которая обеспечивает получение гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей, не нуждающейся в адсорбции гетерологичных антител. Данная схема иммунизации исключает использование ПАФ. Длительность иммунизации короче первой схемы в 2,5 раза, на 21 день после начала иммунизации в РРА титры антител сыворотки листериозной составили 1:1600.

Изучение и оценка стабильности сыворотки листериозной агглютинирующей. Для изучения стабилизации сыворотки листериозной по сохранению биологической структурной целостности МИ использовали четыре препарата, обладающие стабилизирующим действием в различных концентрациях: сорбит – 2,5 %, поливинилпирролидон – 1 %, сахароза – 3 % и тиосульфат натрия – 1 %. В качестве контроля использовали лиофилизированную сыворотку листериозную без стабилизатора. В опыт по стабилизации сыворотки листериозной включены три экспериментальные серии – 41, 42 и 43, полученные по второй схеме иммунизации кроликов-продуцентов. После внесения стабилизаторов сыворотку фильтровали, разливали в ампулы и лиофилизировали. Стабильность сыворотки определяли в изотермическом тесте на «ускоренное старение» антител на 50 % в течение всего срока наблюдения по методике Р. Jemeson (1979).

В ходе экспериментальных работ установлено, что применение 2,5 % сорбита в качестве стабилизатора вызывало окисление сыворотки листериозной, так в контрольной сыворотке средний показатель рН составлял 7,69, а в трех испытуемых сыворотках рН равно 5,85 (слабокислая), что ниже на 1,84 единицы. Применение стабилизаторов (3 % сахароза, 1 % тиосульфат натрия, 1 % поливинилпирролидон) существенно не повлияло на нейтральное значение рН сывороток листериозных испытуемых серий (7,63–7,70), и соответствовало среднему значению кислотности контрольных образцов (рН 7,69).

На низкую остаточную влажность сывороток повлияли все четыре стабилизатора в концентрации от 1,7 до 1,83 % (средний показатель – 1,8 %), кроме 2,5 % сорбитола с влажностью 2,1 %. Согласно требованиям ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 исследуемые сыворотки соответствовали нормируемому показателю потери в массе при высушивании – не более 2,5 %.

Нормируемый показатель растворимости сыворотки составляет не более 10 мин в 1 мл стерильной дистиллированной воды. Растворение сыворотки листериозной с 2,5 % сорбитом и 1 % поливинилпирролидоном в среднем составило по 7,2 мин, 3 % сахарозой – 6,0 мин, 1 % тиосульфатом натрия – 4,2 мин и в комбинации 3 % сахарозы+1 % тиосульфатом натрия – 1,0 мин. У контрольных образцов сывороток время растворения составило в среднем

8,2 мин. Замеры времени растворения сывороток и контрольных образцов показали в среднем 4,3 мин, что свидетельствует об их высокой растворимости.

В контрольных образцах снижение титра АТ на 50 % произошло на 8 сут хранения при температуре 60 °С. Срок снижения на половину титров АТ при температуре хранения 60 °С в сыворотках в среднем составил с 3 % сахарозой + 1 % тиосульфатом натрия – 47 сут, 3 % сахарозой – 38 сут, 1 % тиосульфатом натрия – 37 сут, 1 % поливинилпирролидоном – 30 сут и 2,5 % сорбитом – 15 сут.

Таким образом, в изотермическом тесте на «ускоренное старение» антител в сыворотке листериозной по показателям кислотности, потери в массе при высушивании и растворимости наиболее лучшим стабилизирующим действием обладали стабилизаторы в комбинации 3 % сахарозы и 1 % тиосульфата натрия. Тиосульфат натрия проявляет антиоксидантные свойства, замедляющие процессы окисления. Сахароза, используемая в качестве криопротектора, обладает наиболее выраженным защитным действием для белков при замораживании диагностического препарата (Михайлова В.А., 1997).

Дальнейшие испытания проводили по подбору оптимальных концентраций сахарозы и тиосульфата натрия для стабилизации сыворотки листериозной. Изучено стабилизирующее действие на сыворотку листериозную стабилизаторов сахарозы и тиосульфата натрия различных концентраций от 1,0 до 5,4 % и от 0,3 до 1,8 %, соответственно. Полученные данные показали возможность применения в качестве стабилизатора сыворотки листериозной смеси сахарозы и тиосульфата натрия. Концентрация сахарозы может варьировать от 2,2 до 3,0 %, тиосульфата натрия – от 0,75 до 1,00 %. В дальнейшем в производстве сыворотки листериозной выбраны стабилизаторы и их концентрации – 3 % сахароза и 1 % тиосульфат натрия.

Изучение стабильности сыворотки листериозной для установления срока годности. По результатам долгосрочных испытаний сыворотки листериозной (серий 41, 42 и 43) подтвержден регламентированный срок годности медицинского изделия – 5 лет при температуре хранения 6 ± 2 °С. Методом «ускоренного старения» антител с применением программы «МНК и регрессионный анализ Онлайн + графики» спрогнозирован полный срок годности сыворотки листериозной агглютинирующей до 7 лет. Доказано, что комбинация 3 % сахарозы и 1 % тиосульфата натрия стабилизирует основные качественные показатели (внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность, рН) и повышают устойчивость специфических антител сыворотки листериозной агглютинирующей во время длительного хранения.

При создании условий имитации транспортирования установлено, что при хранении листериозных сывороток при температурах –20 °С, +20 °С и 8 °С (контроль) в течение 7 сут диагностические титры антител в сыворотках оставались на исходном уровне в РРА – 1:400 и ОРА – 1:100.

Изучение стабильности сыворотки листериозной после восстановления показало, что растворенную рабочую сыворотку можно хранить при температуре от 6 ± 2 °С и использовать в течение 24 ч.

Разработка технологической схемы производства сыворотки листериозной агглютинирующей. На основании результатов исследований

разработана технологическая схема производства гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей (Рисунок 5). Утверждена нормативно-техническая документация для производства сыворотки листериозной агглютинирующей: технические условия (ТУ 21.20.23-015-01898090-2018) и промышленный регламент (ПР 01898090-015-17).



Рисунок 5 – Технологическая схема производства сыворотки листериозной агглютинирующей

По технологической схеме производства получено 10 экспериментально-производственных серий сыворотки листериозной агглютинирующей.

Апробация сыворотки листериозной агглютинирующей. Проведена апробация на базе Референс-центра по мониторингу за листериозом (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск) сыворотки листериозной агглютинирующей (серия № 44) со штаммами *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. и гетерологичными штаммами, дана оценка ее эффективности по показателям чувствительности и специфичности. При исследовании 28 штаммов *L. monocytogenes* (*L. monocytogenes* BB-1, *L. monocytogenes* MIB-871, *L. monocytogenes* TVe1895, *L. monocytogenes* TVe2269, *L. monocytogenes* OR-513, *L. monocytogenes* OR-517, *L. monocytogenes* Bel-1, *L. monocytogenes* MO-Ob, *L. monocytogenes* MO-um,

L. monocytogenes ROS150-1, *L. monocytogenes* V12, *L. monocytogenes* V23, *L. monocytogenes* V30, *L. monocytogenes* V40, *L. monocytogenes* V41, *L. monocytogenes* V44, *L. monocytogenes* V59, *L. monocytogenes* V276-2, *L. monocytogenes* V299-1, *L. monocytogenes* Water3, *L. monocytogenes* Water4, *L. monocytogenes* Water5, *L. monocytogenes* ATCC13932, *L. monocytogenes* NCTC10357, *L. monocytogenes* NCTC11994, *L. monocytogenes* 766/1, *L. monocytogenes* 766/mxr, *L. monocytogenes* 766/П), выделенных из клинического материала больных листериозом и различных объектов окружающей среды (мясные и рыбные полуфабрикаты, сточные воды) на территории административного центра (г. Москва) и семи субъектов РФ (Московская, Ярославская, Тверская, Орловская, Белгородская, Ростовская и Вологодская области), в РРА (1:400) наблюдали крупно- и мелкозернистую агглютинацию при полном просветлении жидкости на 4 креста. В ОРА наблюдали четко выраженный агглютинат в капле с сывороткой (1:100) на 3–4 креста. Получены положительные результаты в 100 % случаев в РРА и ОРА. Таким образом, исследуемая сыворотка листериозная обладает высокой чувствительностью, истинная доля сероположительных случаев составила 89,7 %, что доказано расчетами нижней границы доверительного интервала со статистической надежностью 95,0 %.

При определении специфичности сыворотки листериозной использовали 16 штаммов близкородственных микроорганизмов: *L. welschimerii*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murrayi* и шесть гетерологичных штаммов: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. Typhimurium* 21, *Sh. flexneri* 170, *Y. enterocolitica* O3 628/1. В результате проведенных исследований получены отрицательные результаты со всеми 16 штаммами. В РРА наблюдали отсутствие зонтика и просветление жидкости в пробирках, в ОРА микробная взвесь исследуемых штаммов оставалась равномерно мутной без образования агглютината и хлопьев. Истинная доля отрицательных результатов определения специфичности сыворотки листериозной в РА с близкородственными и гетерологичными штаммами составила 87,0 % (нижняя граница доверительного интервала) со статистической надежностью 95,0 %.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой диагностической эффективности сыворотки листериозной агглютинирующей и возможности её применения в клинической лабораторной диагностике для идентификации штаммов *L. monocytogenes* в РА.

ВЫВОДЫ

1. Научно обосновано и экспериментально доказано, что панкреатические гидролизаты рыбной продукции и морепродукта является важнейшим источником белка при производстве питательных сред. Панкреатический рыбный гидролизат сороги с высоким содержанием аминного азота, слабощелочной реакцией кислотности превосходит питательные основы других исследованных ПГ из рыб и морепродукта.

2. Разработанная питательная среда на основе панкреатического гидролизата сороги обеспечивает стабильность тест-штамма *L. monocytogenes*

766 по основным биологическим свойствам. Оценка специфической активности этой питательной среды по чувствительности, скорости роста, эффективности и прорастанию микроорганизма показала преимущества перед другими питательными средами с панкреатическими гидролизатами сельди, минтая и кальмара.

3. Сконструированная питательная среда на основе панкреатического гидролизата сороги обеспечивает получение биомассы штамма *L. monocytogenes* 766 для производства сыворотки листериозной агглютинирующей. Разработан промышленный регламент по производству питательной среды для культивирования листерий.

4. Выбрана оптимальная схема трехкратной иммунизации кроликов-продуцентов (21–22 дня) корпускулярным иммуногеном *L. monocytogenes* 766, использование которого исключает этап адсорбции гетерологичных антител при производстве сыворотки листериозной агглютинирующей.

5. Подобрана эффективная комбинация стабилизаторов и их концентрации (3 % сахара и 1 % тиосульфат натрия), которые сохраняют специфические антитела и основные качественные показатели (внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность, pH) сыворотки листериозной агглютинирующей при температуре хранения 6 ± 2 °С в течение 5 лет. Предложено внесение данных стабилизаторов после этапа консервации сыворотки листериозной, что исключает повторную стерилизацию препарата.

6. Разработана технология производства гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей. Утверждены промышленный регламент и технические условия на сыворотку листериозную агглютинирующую. Проведены клинические и технические испытания сыворотки листериозной агглютинирующей.

7. Полученная гипериммунная высокоспецифичная сыворотка листериозная агглютинирующая обладает чувствительностью 89,7 % и специфичностью 87,0 % и в перспективе может быть использована для индикации *L. monocytogenes* в клинической лабораторной диагностике и научных исследованиях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Панкреатический гидролизат сороги может быть успешно использован в качестве питательной основы при конструировании питательных сред.

2. Сконструированная питательная среда СКЛ на основе панкреатического гидролизата сороги рекомендована для наращивания биомассы *L. monocytogenes* 766, используемой для получения иммуногена в производстве сыворотки листериозной агглютинирующей.

3. Разработанная питательная среда СКЛ пригодна для хранения производственных штаммов *L. monocytogenes*.

4. Предложенная оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов, позволяет в короткие сроки (21–22 дня) получать гипериммунную высокоспецифичную сыворотку листериозную агглютинирующую без этапа адсорбции гетерологичных антител.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Остяк, А.С. Сравнительный анализ состава питательных основ методом спектроскопии ЯМР / А.С. Остяк, И.А. Ушаков, **Н.М. Хаптанова**, Н.Г. Гефан, В.И. Кузнецов, Е.Н. Обороина, С.Н. Адамович, Е.И. Иванова, И.Б. Розенцвейг // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2019. – Т. 9, № 3. – С. 430–438. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-430-438>

2. **Хаптанова, Н.М.** Сравнительная оценка гидролизатов как основы при конструировании питательной среды для культивирования *Listeria monocytogenes* / **Н.М. Хаптанова**, А.С. Остяк, С.В. Лукьянова, В.И. Кузнецов, Н.М. Андреевская, С.Н. Адамович, И.А. Ушаков, С.В. Юденич, С.В. Балахонов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. – Т. 98, № 4. – С. 481–485. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-108>

3. Гефан, Н.Г. Подбор питательной основы и экспериментальная оценка качества бактериологической питательной среды для культивирования листерий / Н.Г. Гефан, С.В. Лукьянова, **Н.М. Хаптанова**, В.И. Кузнецов, Ж.А. Коновалова, Н.М. Андреевская, А.С. Остяк, Е.Ю. Киселева, В.С. Косилко // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2021. – Т. 37. – С. 31–42. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.31>

4. **Хаптанова, Н.М.** Получение и оценка эффективности диагностической агглютинирующей сыворотки для идентификации возбудителя листериоза / **Н.М. Хаптанова**, Н.М. Андреевская, Ж.А. Коновалова, Н.Г. Гефан, С.В. Лукьянова, А.С. Остяк, Н.Н. Карцев, В.Н. Борзенков, С.В. Балахонов // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2021. – Т. 37. – С. 43–53. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.43>

Прочие публикации:

5. Андреевская, Н.М. Изучение стабильности агглютинирующей лиофилизированной листериозной сыворотки / Н.М. Андреевская, В.А. Михайлова, Н.Г. Гефан, **Н.М. Хаптанова**, Ж.А. Коновалова, С.В. Юденич, В.Н. Рычкова // Инфекционные болезни: материалы IX ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, 27–29 марта 2017 г. – Москва, 2017. – Т. 15, Приложение № 1. – С. 21.

6. **Хаптанова, Н.М.** Оценка эффективности экспериментальной питательной среды для культивирования листерий / Н.М. Хаптанова, Н.Г. Гефан, Ж.А. Коновалова, В.И. Кузнецов, В.С. Косилко // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы II Всероссийской научно-практической конференции, 5–6 апреля 2017 г. – Ставрополь, 2017. – С. 285–286.

7. Андреевская, Н.М. Изучение и подбор антигенных и контрольных штаммов *Listeria monocytogenes* для производства листериозной сыворотки / Н.М. Андреевская, В.А. Михайлова, Е.Г. Токмакова, **Н.М. Хаптанова**, А.С. Остяк, А.В. Уланская, С.В. Балахонов, С.В. Лукьянова // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 24–25 апреля 2019 г. – Ставрополь, 2019. – С. 258.

8. **Хаптанова, Н.М.** Особенности серологической диагностики листериоза (обзор литературы) / **Н.М. Хаптанова**, Н.М. Андреевская, С.В. Лукьянова, Ж.А. Коновалова, Н.Г. Гефан, А.С. Остяк, Е.Г. Токмакова // *Acta biomedica scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. – 2019. – Т. 4, № 1. – С. 43–49. <https://doi.org/10.29413/ABS.2019-4.1.7>

9. **Хаптанова, Н.М.** Оценка эффективности сыворотки листериозной агглютинирующей для реакции агглютинации / **Н.М. Хаптанова**, Н.М. Андреевская, Н.Г. Гефан, В.Н. Борзенков, Н.Н. Карцев, Э.А. Светоч, С.В. Балахонов // *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. – 2019. – № 37 – С. 82–83.

10. Гефан, Н.Г. Оценка биологических свойств тест-штамма *Listeria monocytogenes* 766 после длительного хранения на экспериментальной питательной среде для культивирования листерий / Н.Г. Гефан, Н.М. Андреевская, С.В. Лукьянова, **Н.М. Хаптанова**, В.И. Кузнецов, В.С. Косилко, С.В. Балахонов // *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. – 2019. – № 37 – С. 83–85.

11. **Хаптанова, Н.М.** Изучение физико-химических и биологических свойств питательной среды для культивирования листерий / **Н.М. Хаптанова**, Н.М. Андреевская, С.В. Лукьянова, В.И. Кузнецов, Ж.А. Коновалова, В.А. Михайлова, А.С. Остяк, В.С. Косилко, С.В. Балахонов // *Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 24–25 апреля 2019 г. – Ставрополь, 2019.* – С. 291–292.

12. **Хаптанова, Н.М.** Конструирование питательной среды для культивирования листерий / **Н.М. Хаптанова**, С.В. Лукьянова, В.И. Кузнецов, Н.Г. Гефан, Н.М. Андреевская, Ж.А. Коновалова, А.С. Остяк, В.С. Косилко // *Acta biomedica scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. – 2020. – Т. 5, № 4. – С. 60–66. <https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.4.8>

13. **Хаптанова, Н.М.** База данных: Питательные среды для культивирования, выделения и идентификации листерий / **Н.М. Хаптанова**, В.И. Кузнецов, О.Н. Ивашкова, Н.Г. Гефан, А.С. Остяк, С.В. Лукьянова, С.В. Балахонов // *Свидетельство о регистрации базы данных 2020621065, 25.06.2020. Заявка № 2020620898 от 09.06.2020.*

14. **Хаптанова, Н.М.** Современные методы определения диагностической эффективности агглютинирующей листериозной сыворотки в клинической диагностике листериоза / **Н.М. Хаптанова**, Ж.А. Коновалова, Н.М. Андреевская, Н.Г. Гефан, И.И. Баертуева, И.Б. Вершинская // *Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 15–17 сентября 2021 г. – Екатеринбург, 2021.* – С. 323–325.

15. Андреевская, Н.М. Современные подходы к оценке диагностической эффективности листериозной сыворотки в серологических исследованиях / Н.М. Андреевская, Н.Г. Гефан, Ж.А. Коновалова, **Н.М. Хаптанова** // *Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия*

в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней: материалы XV Межгосударственной научно-практической конференции, 5–6 октября 2021 г. – Иркутск, 2021. – С. 20–21.

16. Andreevskaya, N.M. The efficacy evaluation of listeriosis agglutinating serum in the instant diagnosis of listeriosis / N.M. Andreevskaya, N.G. Gefan, Zh.A. Konovalova, **N.M. Khaptanova**, I.B. Vershinskaya, I.I. Baertueva // Current issues on zoonotic diseases: materials of 24th International scientific conference, September 21, 2021. – Ulaanbaatar, 2021. – P. 54–55.

17. Кузнецов, В.И. Питательная среда для получения биомассы листерий / В.И. Кузнецов, **Н.М. Хаптанова**, Н.Г. Гефан, О.Н. Ивашкова, А.С. Остяк, В.С. Косилко, С.В. Балахонов // Патент RU 2767782 C1, 21.03.2022. Заявка № 2021116115 от 02.06.2021.

18. Андреевская, Н.М. Совершенствование технологии производства агглютинирующей листерионной сыворотки / Н.М. Андреевская, Ж.А. Коновалова, **Н.М. Хаптанова**, Н.Г. Гефан, С.В. Юденич // Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока: материалы Региональной научно-практической конференции с международным участием, 15 ноября 2022 г. – Иркутск, 2022. – С. 13–14.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	– антиген
АТ	– антитело
ГРМ-агар	– питательный агар для культивирования микроорганизмов
КОЕ	– колониобразующая единица
м.к.	– микробных клеток
МПА	– мясо-пептонный агар
ОРА	– ориентировочная реакция агглютинации
ОСО	– отраслевой стандартный образец
ПБА	– патогенные биологические агенты
ПГ	– панкреатический гидролизат
РРА	– развернутая реакция агглютинации
РФ	– Российская Федерация
сут	– сутки
ч	– час
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
pH	– концентрация водородных ионов