

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

На правах рукописи

Хаптанова Наталья Маркеловна

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

Специальности:

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Балахонов Сергей Владимирович

Иркутск – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Особенности биологических свойств <i>Listeria monocytogenes</i>	15
1.2 Антигенная структура листерий	23
1.3 Получение листериозных агглютинирующих сывороток	25
1.4 Стабилизация диагностических сывороток	28
1.5 Питательные потребности листериозного микроба	29
1.6 Лабораторная диагностика листериоза	34
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	40
2.1 Штаммы	40
2.2 Питательные среды	42
2.3 Лабораторные животные-продуценты	43
2.4 Сыворотка листеризная агглютинирующая	44
2.5 Приготовление панкреатических гидролизатов из белкового сырья.....	44
2.6 Ядерная магнитно-резонансная спектроскопия (ЯМР- спектроскопия) панкреатических гидролизатов	45
2.7 Физико-химические методы исследования питательной среды для культивирования листерий	46
2.8 Биологические методы исследования питательной среды для культивирования листерий	48
2.8.1 Определение чувствительности и скорости роста тест-штамма <i>L. monocytogenes</i> 766 на питательной среде для культивирования ли- стерий	48

2.8.2 Определение показателя эффективности питательной среды для культивирования листерий	47
2.9 Метод перевиваемых культур	48
2.10 Методы изучения иммуногена	49
2.10.1 Способ получения иммуногена.....	49
2.10.2 Определение белка в иммуногене по методу Лоури	49
2.10.3 Определение общего содержания углеводов в иммуногене в реакции с фенолом	49
2.10.4 Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот в иммуногене.....	50
2.11 Серологические методы	50
2.11.1 Постановка ориентировочной реакции агглютинации	50
2.11.2 Постановка развернутой реакции агглютинации	51
2.12 Определение прозрачности, цветности и кислотности сыворотки листериозной	51
2.13 Подготовка штаммов микроорганизмов для определения чувствительности и специфичности сыворотки листериозной.....	52
2.14 Стерилизующая фильтрация сыворотки листериозной	52
2.15 Испытания стабильности сыворотки листериозной и установление срока годности	52
2.16 Определение эффективности сыворотки листериозной агглютинирующей для идентификации возбудителя листериоза	54
2.17 Статистические методы	55
ГЛАВА 3. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИСТЕРИЙ	56
3.1 Физико-химические показатели панкреатических гидролизатов ...	56
3.2 Изучение ростовых свойств <i>L. monocytogenes</i> 766 на питательных средах с добавлением панкреатических гидролизатов	60

3.3 Конструирование питательной среды для культивирования листерий и изучение ее ростовых свойств	64
3.4 Контроль качества питательной среды для культивирования листерий по физико-химическим и биологическим показателям.....	70
3.5 Оценка способности тест-штамма <i>L. monocytogenes</i> 766 к сохранению биологических свойств на питательной среде для культивирования листерий	71
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СЫВОРОТКИ ЛИСТЕРИОЗНОЙ АГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ	77
4.1 Подбор схемы иммунизации кроликов-продуцентов	77
4.2 Изучение и оценка стабильности сыворотки листериозной агглютинирующей	81
4.3 Этап стабилизации сыворотки листериозной агглютинирующей...	87
4.4 Изучение стабильности сыворотки листериозной для установления срока годности.....	88
4.5 Разработка технологической схемы производства сыворотки листериозной агглютинирующей	99
4.6 Апробация сыворотки листериозной агглютинирующей	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	106
ВЫВОДЫ	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	–	антиген
АТ	–	антитело
ГОПМВ	–	гидролизат отходов производства мясной воды
ГРМ-агар	–	питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой
ЗФР	–	забуференный физиологический раствор
ИФА	–	иммуноферментный анализ
КОЕ	–	колониеобразующая единица
МИ	–	медицинское изделие
м.к.	–	микробных клеток
МПА	–	мясо-пептонный агар
МПБ	–	мясо-пептонный бульон
ОСО	–	отраслевой стандартный образец
ПБА	–	патогенные биологические агенты
ПАФ	–	полный адъювант Фрейнда
ПГ	–	панкреатический гидролизат
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РА	–	реакция агглютинации
рН	–	концентрация водородных ионов
РНГА	–	реакция непрямой гемагглютинации
РСК	–	реакция связывания комплемента
РФ		Российская Федерация
СКЛ	–	питательная среда для культивирования листерий
сут	–	сутки
ЯМР	–	ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Листериоз – инфекционное сапро-зоонозное 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 [39, 52, 186, 229].

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 [43, 86, 87, 92, 128].

В практике лабораторной диагностики серологические методы исследования листериоза остаются востребованными для индикации возбудителя. Одним из специфичных, надежных и доступных серологических методов обнаружения возбудителя листериоза является реакция агглютинации (РА), для постановки которой необходимы листериозные агглютинирующие сыворотки. Для усовершенствования лабораторной диагностики листериоза необходимо улучшение качества существующих и создание новых медицинских изделий (МИ) [71, 72, 88, 94, 127].

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 которых 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. 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.) [141]. В ка-

честве источника белка в производстве питательных сред возможно использование панкреатических рыбных гидролизатов [91, 104]. 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*) [62, 63, 129]. Сорога, обитающая в прибрежной соровой системе бассейна озера Байкал, является рыбой пониженной товарной ценности и использование ее в качестве основ питательных сред экономически целесообразно [41, 56, 85, 109].

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. [8]. В 2000-х гг. типовые поливалентные и моновалентные (1 и 2 серотипов) листериозные сыворотки производили в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Покров) [45]. Несмотря на имеющиеся технологические разработки, в настоящее время, серийное производство этих препаратов в нашей стране отсутствует.

В настоящее время в России для лабораторной диагностики листериоза используется латексная тест-система *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 исследования. 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 морепродуктов 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 сроки ее годности.
5. Разработать технологию производства сыворотки листериозной агглютинирующей.

Научная новизна работы

Впервые, с использованием микробиологических, биохимических методов и ЯМР-спектроскопии, показано, что панкреатический гидролизат сороги является полноценной питательной основой для культивирования *Listeria monocytogenes* 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 испытательский институт пищевой микробиологии».

тельный 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 и методы исследования.

Основой методологии в диссертационной работе явились изучение микробиологических и иммунологических подходов в производстве медицинских изделий. Использованы методы лабораторных исследований. Биологический метод использован при иммунизации кроликов-продуцентов. Бактериологические методы применяли для получения бактериальной массы листерий, определения биологических свойств питательной среды для культивирования листерий. Физико-химические методы использовали при определении кислотности (pH), потерь в массе при высушивании, прочности студня по Валенту и содержание аминного азота в сконструированной питательной среде для культивирования листерий. Серологическим методом определяли чувствительность и специфичность сыворотки листериозной агглютинирующей. Протеометрический метод применяли для идентификации тест-штамма *L. monocytogenes* 766. Методом ЯМР-спектроскопии устанавливали аминокислотный состав.

кислотный состав панкреатических рыбных гидролизатов. Полученные результаты обработаны стандартными статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту:

1. Панкреатический гидролизат сороги по физико-химическим и биологическим показателям является полноценной белковой основой для питательной среды для культивирования *L. monocytogenes* 766.
2. Питательная среда на основе панкреатического гидролизата сороги для культивирования листерий обеспечивает получение биомассы *L. monocytogenes* 766 через 24 ч.
3. Схема трехкратной иммунизации кроликов-продуцентов комбинированным (внутривенное и внутримышечное) введением корпускулярного иммуногена *L. monocytogenes* 766 стимулирует выработку стабильных специфических антител.
4. 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.
5. Разработана технология производства стабильной гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей без адсорбции гетерологичных антител.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Степень достоверности результатов работы подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, полученных результатов 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 Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Ро-

спотребнадзора «Диагностика, профилактика и эпидемиологический надзор за природноочаговыми и другими инфекционными болезнями» (г. Иркутск, 2018 г.); II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2017 г.); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2019); Международной научной конференции «Современные проблемы зоонозных болезней» (г. Улан-Батор, Монголия, 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); Международной конференции по «Актуальным проблемам зоонозных инфекций» (Улан-Батор, Монголия, 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, 2018-2022).

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 и 23 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы исследования», двух глав собственных исследований, заключения, выводов, 11 приложений, списка ис-

пользованной литературы, включающего 237 источников, в том числе 94 зарубежных.

Место выполнения и личный вклад автора. Работа выполнялась в рамках плановой научной темы: «Технология получения питательной среды для культивирования листерий и получение агглютинирующей листериозной сыворотки» (2016-2017 гг.) (Рег. № НИОКТР АААА-А16-116042710051-2).

Автором проведен анализ литературных источников по теме исследования, определена цель работы, осуществлен выбор путей решения задач. Основная часть экспериментальной работы (бактериологические, биохимические, 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА

1.1 Особенности биологических свойств *Listeria monocytogenes*

Первые упоминания о возбудителе листериоза обнаруженном у кроликов датированы 1892 г. во Франции [139]. E.G.D. Murray (1926) описал одного из представителей бактерий рода *Listeria* выделенного при исследовании эпизоотии среди лабораторных животных (кроликов и морских свинок) в питомнике Кембриджского университета. Учитывая, что данная болезнь у животных характеризовалась моноцитозом, микроорганизму дали название *Bacterium monocytogenes*. J.H.N. Pirie (1927) выделил идентичную бактерию из печени песчанок и предложил название рода *Listerella*, в честь выдающегося хирурга лорда Листера. В 1948 г. принято официальное название *Listeria monocytogenes* в 6-ом издании Руководства Берджи по детерминантной бактериологии [175].

А. Ньюфельдт (1929) впервые выделил культуру листерий из крови человека с моноцитарной ангиной. В 80-х гг. прошлого столетия отмечался рост числа зарегистрированных случаев листериоза в ряде стран Западной Европы (Франция, Великобритания, Швейцария, Финляндия) и Северной Америки (США, Канада) с числом инфицированных до трехсот человек. Заболевания людей связаны с употреблением пищевых продуктов животного (мягкие сыры, мясные полуфабрикаты, колбасные изделия в вакуумной упаковке, сосиски, сливочное масло и др.) и растительного (овощные салаты, капуста) происхождения, а также морепродуктов (моллюски, креветки) [42, 103, 128, 151, 166, 218, 226]. Листериоз, как заболевание преимущественно пищевого происхождения, вызывает особый интерес для здравоохранения из-за тяжести заболевания (менингит, сепсис и аборт), высокой смертности (до 40 %) и длительности инкубационного периода, который колеблется в широких пределах от 3 до 70 дней. Кроме того, у людей с хроническими заболева-

ниями при инфицировании *L. monocytogenes* происходит нарушение Т-клеточного иммунитета [46, 65, 145].

Листериоз впервые описан в СССР в 1936 г. Т.П. Слабоспицким у свиней, в 1940 г. П.П. Сахаровым и И.С. Истоминым у кроликов. В 1949 г. А.Ф. Билибин представил общую симптоматику листериоза и клинику некоторых форм менингоэнцефалита у людей [6]. В нашей стране официальная регистрация листериоза начата с 1956 г. – у животных и с 1992 г. – у людей [128].

Ранее считалось, что из шести широко распространенных видов листерий: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welsimeri*, *L. grayi* патогенным для человека и животных являлся только вид *L. monocytogenes* [116, 182, 210]. Однако, позднее были зарегистрированы случаи инфицирования человека, вызванные *L. ivanovii* и *L. seeligeri* [173]. A.D. Hitchins сообщал о неоднократных случаях заболевания населения листериозом, вызванным *L. ivanovii*, которая ранее считалась патогенной только для животных [176, 177, 208]. Позже появились случаи заболевания у людей, причиной которых являлись другие виды листерий, ранее считавшиеся непатогенными [206, 210, 211]. У пациента с острым гнойным менингитом, выделен штамм *L. seeligeri*, впоследствии возникли неврологические заболевания – эпилепсия и гидроцефалия [210]. Во Франции смертельным исходом закончился случай септицемии у женщины (62 года) вызванной *L. innocua* [196]. Также были случаи выделения у людей *L. welshimeri* [146] и *L. grayi* [206].

L. monocytogenes является грамположительным, факультативно-анаэробным, внутриклеточным патогеном, который вызывает эпидемиологические вспышки и спорадические случаи листериоза [148, 154].

В период с 2015 по 2019 гг., по данным Европейского центра по контролю за заболеваниями (ECDC) и Европейской службы по безопасности продуктов (EFSA) причиной вспышек листериоза в ряде стран Европы (Австрия, Великобритания, Дания, Финляндия и Швеция) являлось замороженное зерно кукурузы производства Польша. Летальность составляла 18,8 % от общего числа заболеваний. В мае 2018 г. в Швеции произошло несколько

случаев заболевания листериозом с летальными исходами, вероятно вызванные употреблением картофельного пюре.

По данным ВОЗ, неблагополучная эпидемиологическая ситуация по листериозу наблюдалась в ЮАР в период с января 2017 г. по июль 2018 г., где подтверждено 1060 случаев заболевания среди людей, из них 216 (20,4 %) с летальным исходом. В июне 2019 г. в Великобритании подтверждено девять случаев данного заболевания. В США по состоянию на сентябрь 2019 г. выявлено 10 заболевших листериозом с одним летальным исходом. В сентябре 2019 г. в Испании подтверждено 222 случая листериоза, трое заболевших умерло [162, 187, 214, 221]. В Швейцарии в мае 2020 г. вследствие употребления полутвердых сыров «Käserei Vogel AG» произошла вспышка листериоза, заболело 11 человек с двумя летальными исходами. В марте 2020 г. в США при употреблении в пищу грибов энoki, заболело 36 человек, четверо умерло [28].

В Российской Федерации заболеваемость листериозом у людей официально регистрируется санитарно-эпидемиологической службой и Министерством здравоохранения с 1992 г. В период с 2005 по 2017 гг. на территории РФ заболеваемость регистрировалась преимущественно среди взрослого населения – 75,78 %, детей – 24,22 %, в том числе новорожденных – 6,25 %. По статистическим данным в эти годы наблюдается увеличение доли тяжёлых и среднетяжёлых форм листериоза до 47,0 % [57]. В 2018 г. отмечался рост заболеваемости листериозом на 44,4 %, болезни подвержены беременные, дети неонатального возраста и лица от 41 до 96 лет с отягощенным анамнезом другими заболеваниями и иммунодефицитными состояниями [61].

Листерии распространены в окружающей среде (почве, воде, придонном иле и растениях), способны выживать и размножаться в широком диапазоне температур и кислотности, выдерживать замораживание, высушивание, присутствие высоких концентраций натрия хлорида (10-20 %) [22].

Листерии культивируются в температурном диапазоне от 1,0 до 46,5 °C и pH среды от 4,0 до 9,6, выдерживают низкие температуры и способны раз-

множаться при 4-6 °С в почве, воде, на растениях и в секционном материале. В пищевых продуктах (молоко, масло, сыр, мясо и др.) листерии размножаются при температуре холодильника 4-6 °С, а при прогревании при 70 °С погибают через 20-30 мин, при 100 °С – через 3-5 мин; инактивируются при обработке растворами формалина (0,5-2,0 %), хлорамина (3-5 %) и другими дезинфицирующими средствами со сроками экспозиции от 10-60 мин [65, 11, 101, 87]. На питательных средах листерии могут расти в температурном диапазоне от -4 до +50 °С, оптимум составляет +37 °С [164, 230, 236].

Листерии устойчивы в 20 % растворе натрия хлорида и при этом не утрачивают способности к размножению [170]. При использовании комбинированного действия физических (температура +45 °С) и химических (20 % натрия хлорид и др. химических соединений, используемых в производстве пищевых продуктов) факторов происходит элиминация листерий [59, 163].

Установлена способность листерий проникать из почвы в вегетативные органы растений через корневую систему и сохраняться там в высокой концентрации [67, 99, 127]. В связи с этим возможно заражение листериозом животных через инфицированные сельскохозяйственные корма. В Ирландии данное заболевание получило название «силосная болезнь» [175]. В исследованиях А.А. Власова (2009) определена высокая выживаемость листерий при искусственной контаминации ими проростков овса, что говорит о культивируемом состоянии популяции бактерий в растениях [27].

Известно, что одним из механизмов адаптации *L. monocytogenes* является способность к существованию и размножению в составе биопленок под влиянием абиотических (замораживание, высушивание и т.д.) и биотических факторов [120, 190, 234]. К биотическим факторам среды, способствующим выживанию листерий, относятся биоценоз с сапротрофными микроорганизмами в продуктах питания, в морских экосистемах с простейшими, водорослями, членистоногими и червями [15, 19, 44, 237]. Листерии способны формировать биопленку как в организме носителя, так и во внешней среде [106, 193]. По данным ряда авторов, биопленкообразование *L. monocytogenes* воз-

можно на продуктах питания при низких положительных температурах [33, 106, 118, 119, 189, 204]. Определена способность к образованию биопленок *L. monocytogenes*, относящихся к I и II филогенетическим линиям, как в монокультуре, так и в консорциуме с бактериями вида *Bacillus pumilus* на стекле [23, 167]. Растения, синтезирующие гидрофильные аминокислоты, углеводы, фитогормоны, ферменты и др., также могут способствовать образованию биопленок листерий на поверхностных структурах растительных тканей [34].

Ю.Г. Костенко (1997), S.C. Foong (2004) полагали, что листерии, обитающие в почве, при неблагоприятных абиотических и биотических условиях способны переходить в некультивируемое состояние на питательных средах, что исключает их обнаружение бактериологическим методом [59, 168]. Листерии, находящиеся в покоящейся форме, могут длительное время существовать в почве в высоких концентрациях, а при изменении условий способны к реверсии в вегетативные формы [32, 110]. В исследованиях А. Locatelli (2013), анализ выживаемости бактерий показал, что *L. monocytogenes* способна сохраняться до 84 суток в 71 % исследованных почв, в остальных почвах (29 %) наблюдалась лишь кратковременная выживаемость (до 14 дней). Также обнаружено, что эндогенная микробиота почвы может снизить выживаемость *L. monocytogenes*, особенно в щелочных почвах ($\text{pH} > 7$), тогда как в кислых, коэффициенты выживаемости в стерилизованных и нестерилизованных образцах статистически не различались [183].

Тяжёлое течение листериоза, а иногда и летальные исходы, объясняются тем, что листерии – внутриклеточные паразиты. Для ученых представляет интерес изучение внутриклеточного паразитизма на примере листерий, поскольку, бактерии этого вида являются одной из популярных моделей с помощью которых исследуют данный феномен [201, 217]. Листерии способны проникать в большинство клеток-хозяев, включая эпителиальные клетки, гепатоциты, фибробласты, эндотелиальные клетки и даже макрофаги [161], также способны выживать и размножаться внутри фагоцитов, уклоняясь от атак со стороны антимикробных факторов [30].

Основными путями передачи листериозной инфекции являются: алиментарный (пищевой), контактный, аэрогенный, трансмиссивный, перинатальный, так же описаны случаи передачи возбудителя половым путем [102, 137].

При пищевом пути инфицирования, бактерии из кишечника попадают в кровоток и распространяются по всему организму, поражая преимущественно печень и головной мозг [13, 140]. *L. monocytogenes* способна преодолевать эпителий кишечника, гематоэнцефалический и плацентарный барьеры, вызывая тяжелые системные заболевания [148].

Клетка бактерии состоит из воды на 70,0-80,0 % от общей массы, остальное приходится на долю сухого вещества. Около половины сухого вещества клетки бактерий составляют белки (52,0 %), в меньшей доле углеводы (17,0 %), липиды (9,0 %), РНК (16,0 %), ДНК (3,0 %) и минеральные вещества (3,0 %). Некоторые бактериальные белки являются антигенами и токсинами бактерий. Полисахариды входят в состав некоторых капсул и клеточной стенки, также принимают участие в формировании антигенов [68].

L. monocytogenes содержит клеточную стенку, образованную многослойным пептидогликаном, с которым ковалентно связаны тейхоевые кислоты. Также имеются липотейхоевые кислоты гидрофобно связанные с цитоплазматической мембраной [203]. Эти полимеры участвуют в регуляции деления бактерии и в адгезии на клетках организма при инфицировании [98].

Пептидогликан является платформой, на которой закрепляются поверхностные белки. Бактериальные поверхностные белки представляют собой разнообразную группу молекул, участвующих в различных важных процессах, таких как рост бактерий, восприятие и защита от стрессов окружающей среды, адгезия, вторжение в клетку-хозяина, передача сигналов и взаимодействие с иммунной системой. Сходство с грамотрицательными бактериями, такими как *Escherichia coli* является одной из характеристик пептидогликана листерий [203, 212]. Это полимер чередующихся звеньев дисахарида

N-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc)-(β-1,4)-N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), сшитых пептидными мостиками [160].

Вторичные полимеры клеточной стенки *L. monocytogenes* содержат: тейхоевые кислоты, которые ковалентно связаны с пептидогликаном и липотейхоевой кислотой, которые встроены в плазматическую мембрану диацилглицеролипидом [191]. Эти полимеры выполняют важные функции в гомеостазе катионов металлов, закреплении поверхностных белков и транспорте ионов, питательных веществ и белков, и являются главными детерминантами поверхностной иммуногенности, составляя основную часть разнообразия серотипов, известных у *L. monocytogenes* [144, 185]. При изучении *L. monocytogenes* определили связь между ее вирулентностью и d-аланилированием липотейхоевой кислоты. Общий заряд липотейхоевых кислот является важным фактором адгезии. Инактивация гена *dlt* у *L. monocytogenes*, приводит к потере остатков d-аланина липотейхоевой кислотой, что весьма ослабляет вирулентность микроорганизма, т.е. происходит увеличение плотности отрицательного заряда поверхности, что вызывает ослабление адгезии клеток [144].

Листерийная мембрана имеет толщину 9 нм и состоит из белка (55,0-60,0 %), липидов (30,0-35,0 %) и углеводов (1,3-2,3 %) (глюкоза, галактоза, рибоза и арабиноза) [172]. Липиды состоят на 80,0-85,0 % из фосфолипидов (фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин и фосфогликолипид) [228]. В составе жирных кислот мембраны *L. monocytogenes* в большей степени преобладают жирные кислоты с разветвленной цепью (> 90 % от общего содержания жирных кислот) [147].

В настоящее время *L. monocytogenes* представляет собой один из наиболее хорошо изученных и охарактеризованных моделей внутриклеточного паразитизма. Поэтому основными этапами внутриклеточного паразитизма, являются взаимодействие специфических рецепторов между эукариотической клеткой и листериями; активация фагоцитоза, вследствие чего, бактерия оказывается в первичной фагосоме, покрытая однослойной мембраной;

затем происходит лизис первичной вакуоли; деление эукариотической клетки в цитоплазме; после чего происходит процесс образования актина, необходимого для продвижения микроорганизма по цитоплазме; далее происходит проникновение в расположенную рядом клетку за счет «продавливания» мембраны и образование инвагинации в соседней клетке; растворение вторичной вакуоли, которая окружена двойной мембраной; в результате начинается новый цикл деления, начинающийся в соседней клетке [128].

Важную роль при взаимодействии листерий с эукариотической клеткой играет целый ряд поверхностных белков и биологически активных молекул. Каждый этап внутриклеточного паразитизма *L. monocytogenes* связан с продукцией определенного фактора патогенности. Большинство изученных факторов патогенности имеют белковую природу, которые обладают метаболической (в частности ферментативной) активностью. К наиболее важным факторам патогенности листерий относится листериозин О (LLO), играющий решающую роль в выходе бактерий из фагосомного компартмента и представляет собой экзотоксин, кодируемый геном *hly*, при нарушениях в котором происходит потеря гемолитической активности и вирулентности у *L. monocytogenes*.

К факторам патогенности *L. monocytogenes* относят ферментные субстанции: фосфатидилинозитолспецифичная фосфолипаза А (PlcA), которая участвует в лизисе мембраны вакуольной фагосомы и фосфатидилхолинспецифичная фосфолипаза В (PlcC) обладает гемолитической активностью. Так же к факторам патогенности относятся поверхностные белки: интерналин А (*inl A*) участвует в инвазии эпителиальных клеток и интерналин В (*inl B*) необходим для инвазии гепатоцитов. Внеклеточный белок Р60 – муреингидролаза имеется у всех видов листерий, вовлечен в инвазию клеток млекопитающих и экспрессируется в процессе размножения листерий в клетках человека или животных. Поверхностный белок клеток ActA способствует перемещению листерий в цитоплазме эукариотической клетки и проникновению в соседние клетки. Полипептид металлопротеаза (*mpl*) переводит неак-

тивную форму лецитиназы (33 кДа) в активную (29 кДа). Активация генов патогенности листерий возможна только в результате возникновения сразу нескольких внешних сигналов, которые поступают при попадании микроба в эукариотический организм [65, 128, 82, 216].

Достаточно хорошо изучены факторы патогенности листерий, которые играют ключевые роли на разных ступенях бактериального процесса; генов, определяющих их синтез; а также механизмов регуляции их экспрессии.

1.2 Антигенная структура листерий

Серотипирование является основным методом определения внутри-родовой структуры рода *Listeria*. Первая антигенная листериозная схема разработана более 80 лет назад J.St. Paterson (1939), который описал первые четыре серовара. J. Donker-Voet (1972) расширила серологическую структуру листерий, дополнив сероварами 4с, 4d, 4е, 1а, 3а, позже были добавлены 6 и 7. Н.Р.Р. Seeliger (1979) проводя анализ О-антигенов листерий, выделил их в 4-ый тип – подтипы 4а и 4в. Болгарский ученый И.И. Иванов (1962) выделил от абортированных овец атипичные штаммы листерий, обладающие выраженной гемолитической активностью и наличием нового соматического антигена (серовар 5) и отнес их к виду *L. bulgarica*. Позднее переименовали в *L. ivanovii* [65].

Изучая листериозные культуры, Н.Р.Р. Seeliger обнаружил группу штаммов, которые отличались по Н-антигену, и выделил их в вид *L. gray*. Далее, в период с 1965 по 1980 гг., проводя серотипирование выделенных штаммов листерий, он определил, что часть из них не обладала патогенными и гемолитическими свойствами, и характеризовалась определенными антигенными свойствами (серовары 6а и 6b), которым дано название *L. innocua* [215].

Антигенная структура рода *Listeria* состоит из 16 серологических вариантов (1/2а, 1/2b, 1/2с, 3а, 3b, 3с, 4а, 4ab, 4b, 4с, 4d, 4е, 7, 5, 6а, 6b) на основе соматических (О) и жгутиковых (Н) антигенов. В отечественной классифика-

ции подразделяется на первую группу серовариантов – 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c и вторую – 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7, 5, 6a и 6b [10, 65, 75].

Известно, что вид *L. monocytogenes* имеет сложную антигенную структуру и делится на 13 серовариантов (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) [215, 127]. Около 90 % всех случаев заболеваний листериозом приходится на штаммы *L. monocytogenes* трех серовариантов – 1/2a, 1/2b и 4b [45, 224, 231, 232, 235]. При этом штаммы сероварианта 4b в основном встречаются при эпидемических вспышках листериоза, а сероварианты 1/2a и 1/2b при спорадических случаях инфицирования *L. monocytogenes* [155]. Листерии сероварианта 4b более адаптированы к размножению в клетках млекопитающих, чем штаммы сероварианта 1/2 [45, 127].

Проведенные зарубежными учеными молекулярно-генетические исследования показали, что изоляты *L. monocytogenes* образуют структурированную популяцию, состоящую из четырех эволюционных ветвей (I, II, III и IV) с разными, но пересекающимися экологическими нишами. Впервые J.C. Piffaretti et al. (1989) описаны серотипы *L. monocytogenes* в виде двух филогенетических линий (I и II). Филогенетическая линия I включает четыре сероварианта (1/2b, 3b, 3c, 4b), изолированные из различных источников, в том числе от человека, линия II содержит три сероварианта (1/2a, 1/2c, 3a), выделенные из окружающей среды и пищевых продуктов [199]. Большинство вспышек листериоза у людей связано с изолятами линии I. Штаммы линии II часто обнаруживают в окружающей и сельскохозяйственной среде и пищевых продуктах, а также выделяют у заболевших листериозом людей и животных [153]. В 1995 г. O.F. Rasmussen предложил III линию, в которую входили три сероварианта (4a, 4b, 4c), большинство изолятов выделены от жвачных животных [207]. В 2006 г. A.J. Roberts определил линию IIIb, а в 2008 г. T.J. Ward переименовал ее в IV линию с тремя серотипами (4a, 4b, 4c) [209]. Штаммы линий III и IV редко встречаются и преимущественно изолированы от больных животных [194].

При этом, закономерности между серологическими вариантами выделяемых штаммов и биологическим типом хозяина, а также формой заболевания не выявлены. Кроме того, серотипы листерий не являются видоспецифичными и могут быть общими одновременно для нескольких видов, исключение составляет серовар 5, характерный только для *L. ivanovii* [54]. В связи с этим возможно получение ложноположительного или ложноотрицательного результата серологического метода исследования в лабораторной диагностике листериоза. В этом аспекте необходимо дальнейшее изучение антигенной структуры и генома бактерий рода листерий, а также разработка более специфичных медицинских изделий для диагностики возбудителя.

1.3 Получение листериозных агглютинирующих сывороток

Серологическая идентификация микроорганизмов основана на взаимодействии антигенов микробной клетки с соответствующими им антителами, содержащимися в иммунной сыворотке. Реакция между антигеном и антителом определяет характер их взаимодействия: агглютинация, преципитация, бактерилиоз и т.д. Одной из наиболее распространенных является реакция агглютинации [66, 77, 112, 117].

В производстве агглютинирующих сывороток важными моментами являются подбор животных-продуцентов, разработка схемы иммунизации (безопасные и эффективные дозы антигена, способы и кратности его введения, интервалы между инъекциями и т.д.), стабильность и стандартность полученного диагностического препарата [69, 117].

При выборе схем иммунизации животных-продуцентов необходимо учитывать возможность возникновения специфической иммунологической толерантности к вводимому антигену [124, 134].

Разработкой технологий получения листериозных агглютинирующих сывороток занимались многие отечественные и зарубежные исследователи Н.А. Михайлова (1959), Л.А. Буренкова (1962), Н.С. Огнева (1963), К.Н. Шлыгина (1963), И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Д.А. Васильев (1968), Т.И.

Егшатын (2002), Е.В. Алиева (2008), Н.Р. Seeliger (1961), J.F. Metzger, C.D. Smith (1962) и др. [8].

В опытах А.И. Смирнова (1958) после иммунизации кроликов разными способами, агглютинины появлялись на 4-7 день, постепенно нарастали и достигали максимального накопления к 10-12 дню (1:1600). У экспериментально инфицированных листериозом овец, И.А. Бакулов (2016) наблюдали появление агглютининов на пятый день, максимальное накопление антител отмечалось на 10-15 день (1:1600-1:3200), через месяц титр в РА был в пределах 1:25-1:400 [8].

В качестве животных-продуцентов используются лошади, бараны, кролики и др., применение которых зависит от поставленных задач производства сывороток. Рационально в качестве основного продуцента диагностических сывороток использование кроликов, так как уровень нормальных антител у них значительно ниже, по сравнению с другими животными (лошади, ослы, бараны) [135]. Антитела в кроличьих сыворотках соответствуют группировкам из 2-6 сахаров в молекуле О-антигена. Поскольку таких одинаковых группировок в полисахаридах антигенов разных О-групп не встречается, такие сыворотки дают меньше перекрестных реакций, поэтому специфичность кроличьих сывороток выше, чем у других животных. Кроме того, у кроликов уровень антител после первичного введения антигена быстрее достигает максимальных значений и медленнее снижается [3,117, 165, 222].

При различных способах введения антигена (подкожно, внутривенно и т.д.) в макроорганизм возникает разная интенсивность антителообразования. Одной из причин является неодинаковое проявление иммунологической памяти у лабораторных животных. В работах В.И. Курловой (1974), А.Н. Мешаловой (1974), С.И. Елкиной (1974) отмечено, что при энтеральном введении антигена стимуляция антителообразования у животных наиболее слаба. Подкожная иммунизация вызывает менее интенсивное образование антител, чем внутрикожная [117]. Общеизвестно, что наиболее эффективным является внутривенное введение антигена, позволяющее за сравнительно корот-

кий период получить высокоактивную сыворотку [78]. На основании производственного опыта и научных исследований предпочтителен комбинированный метод иммунизации животных-продуцентов (например, сочетание внутривенной инъекции с подкожной и т.д.) [1].

Антитела в крови животных, иммунизированных антигенами листерий, появляются после 5-10 дня после введения и нарастают к 15-20 дню. По истечение 30 дней уровень антител снижается и через 60-80 дней в крови животных-продуцентов они регистрируются в низких титрах или не обнаруживаются. В опытах Бакулова И.А. (2016) у кроликов при подкожном способе иммунизации антитела обнаруживались на 5-9 день и достигали максимума на 14-19 день. В зависимости от вводимой дозы, титры антител варьировали от 1:100 до 1:1600. При внутривенной иммунизации в крови кроликов антитела появлялись на 5 день, высокие титры в РА отмечались на 10-15 день (1:800-1:3200) и через месяц титры были в пределах 1:25-1:400. В сравнении с подкожным способом иммунизации, титры агглютининов в крови при внутривенном введении антигенов выше и дольше сохранялись на высоком уровне [8].

По данным А.И. Смирнова (1958), И.А. Попова (1958) и А.Ф. Бабкина (1965) после иммунизации кроликов различными способами, в широком диапазоне варьировали титры антител, сроки их образования и максимального накопления [8].

По технологии получения гипериммунных листериозных сывороток, кроликам-продуцентам вводили внутривенно антигены с промежутком в 3-4 дня. О-сыворотку консервировали 0,5 % раствором фенола, Н (ОН)-сыворотку – 50 % растворами глицерина или мертиолята натрия в разведении 1:10000. Монорецепторные сыворотки получали путем их адсорбции соответствующими корпускулярными антигенами. Для этого к осадку микробных клеток, добавляли сыворотку (1:25), далее выдерживали 24 часа при температуре 37 °С и затем 18-20 часов при 4 °С. Адсорбцию повторяли до

тех пор, пока не получали отрицательный результат в реакции агглютинации с используемым антигеном [8].

Влияние ряда факторов на процесс антителообразования изучено достаточно полно. В производстве агглютинирующих сывороток при получении иммуногена учитывается исходное состояние производственного штамма, его морфологические, тинкториальные, биохимические и культуральные свойства [50]. Штамм микроорганизма должен обладать хорошо выраженными антигенными и иммуногенными свойствами. Также качество антигена зависит от питательной среды и условий культивирования, что необходимо для сохранения в S-форме выращиваемой культуры и соответствующего антигенного комплекса. В сывороточном производстве при получении антигена для иммунизации животных-продуцентов используют суточную культуру микроорганизмов [97, 113]. Несмотря на большое количество разработок и значительные достижения в производстве агглютинирующих сывороток, этапы процесса иммунизации требуют дальнейшего изучения и оптимизации, что позволит получать высокоактивные сыворотки, свободные от перекрестнореагирующих антител, тем самым исключить этап адсорбции гетерологичными микроорганизмами и упростить производство МИ.

1.4 Стабилизация диагностических сывороток

Исследования по улучшению качества иммунобиологических препаратов ведутся в разных направлениях. Одним из них является стабилизация получаемых диагностических сывороток, заключающаяся в сохранении ее структурной целостности и биологической активности в течение длительного времени. Метод лиофилизации – это широко применяемый способ стабилизации в производстве МИ, основанный на предварительном замораживании и сублимации продукта при температуре, обеспечивающей щадящее удаление свободной и связанной влаги [18, 89]. Лиофилизация считается наилучшим способом достижения стабильности качественных показателей диагностических сывороток, кроме того создаются оптимальные условия для предотвра-

щения фрагментации и агрегации белков в процессе хранения и транспортировки [55].

С целью сохранения специфических антительных свойств диагностических препаратов для стабилизации используют многоатомные спирты, углеводы, аминокислоты и т.д. [31, 55]. В исследованиях С.Н. Тюменцева (1993) показано, что внесение смеси сахарозы (3 %) и тиосульфата натрия (1 %), перед фильтрацией готового препарата, заметно повышало стабильность холерных агглютинирующих сывороток [131].

Спектр веществ, используемых для стабилизации, широк и разнообразен. Доказано, что стабилизация иммунобиологических препаратов является перспективной и необходимой процедурой при осуществлении технологического процесса получения диагностических сывороток. Поэтому подбор стабилизаторов для сохранения биологических и физико-химических свойств листериозной агглютинирующей сыворотки остается актуальным.

1.5 Питательные потребности листериозного микроба

Питательные среды играют ключевую роль для обнаружения, выделения и культивирования листерий. В настоящее время исследования по созданию питательных сред базируются на основе современного уровня знаний микробного метаболизма [60].

Важным моментом при конструировании сред является учет питательных потребностей и физиологических особенностей микроорганизма. Для процессов роста и размножения микроорганизмы должны получать питательные вещества в легкоусвояемой форме, необходимые для биосинтеза клеточных компонентов. Содержание этих питательных веществ в культуральной среде должно быть в количествах и соотношениях, отвечающих специфическим потребностям данного микроба [93, 111].

Представители рода *Listeria* не поддерживают рост на минимальных питательных средах, так как нуждаются в некоторых питательных веществах [198, 213]. Установлено, что при анаэробных условиях рост *Listeria* spp. под-

держивают только некоторые гексозы и пентозы, в аэробных условиях, кроме того, – мальтоза и лактоза. *L. monocytogenes* и *L. innocua* в аэробных условиях способны утилизировать глюкозу, лактозу и рамнозу, *L. grayi* – еще и галактозу, а *L. ivanovii* и *L. seeligeri* являются единственными представителями рода *Listeria*, способными утилизировать ксилозу [200]. Из 15 испытанных источников углерода (глицерин, арабиноза, рибоза, ксилоза, глюкоза, фруктоза, манноза, маннит, фукоза, галактоза, рамноза, мальтоза, лактоза, крахмал, казаминовые кислоты) рост *L. monocytogenes* поддерживали только глицерин, глюкоза, фруктоза и манноза [225]. Доказано, что глюкоза не может быть заменена органическими кислотами или аминокислотами, а фруктоза, манноза, целлобиоза, трегалоза, мальтоза, глицерин, глюкозамин, N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота способствуют росту листерий в отсутствие глюкозы [202, 213].

Листерии способны разлагать эскулин до эскулетина (6,7-дигидроксикумарин) и D-глюкозы с помощью фермента β -D-глюкозидазы. Питательные среды, содержащие эскулин, используются в лабораторной диагностике для идентификации листерий. Наличие эскулина и цитрата аммония железа позволяет подтвердить наличие листерий по почернению среды за счет гидролиза эскулина в присутствии ионов железа [58, 197].

В начале 1960-х гг. ученые определили вариабельность питательных потребностей штаммов листерий внутри вида. При изучении питательных потребностей на средах, содержащих минимальный набор аминокислот, витаминов и солей, установлено, что *L. monocytogenes* не способна синтезировать все необходимые для ее жизнедеятельности аминокислоты и витамины [200, 205, 220, 233]. По данным H.N. Tsai (2003) для роста листерий необходимы метионин и цистеин [225].

R.Y. Premarathe (1995) сообщал, что возбудитель листериоза не может использовать неорганические источники азота [195]. По другим данным глютамин может быть заменен солями аммония [225].

H.N. Tsai (2003) изучил влияние лимонноамиачного железа и гемина на рост *L. monocytogenes*. По полученным данным эти препараты в концентрации 0,2 мг/мл увеличивали скорость роста микроорганизма и укорачивали фазу логарифмического роста. Однако в концентрации 20 мг/мл гемин проявлял токсический эффект и значительно уменьшал накопление биомассы, продлевая фазу логарифмического роста. Стимулирующее действие лимонноамиачного железа на рост *L. monocytogenes* отмечал R.E. Cowart [157].

Так, некоторые штаммы *L. monocytogenes* для роста нуждаются в органической сере, валине, изолейцине, другие – только в лейцине, третьи – в лейцине, гистидине и аргинине. При этом рост некоторых штаммов стимулировался глутамином, других, кроме того, – гистидином, аргинином и лейцином. R.J. Premarante (1991) к ростовым факторам *L. monocytogenes* отнес лейцин, изолейцин, аргинин, метионин, валин, цистеин, витамины: рибофлавин, биотин, тиамин, а в качестве важнейших источников углерода и азота рассматривал глюкозу и глутамин [202].

По материалам R. Siddiqi (1989) штаммы *L. monocytogenes* нуждаются в цистине, валине, изолейцине, лейцине, некоторые – в триптофане, и не проявляются потребности в аспарагине, глутамине, пролине, гистидине и тирозине [219]. По другим данным для роста листерий этого вида необходимы только метионин и цистеин, причем последний листерии могли синтезировать самостоятельно путем редукции сульфата до сульфида, который далее конденсировался с О-ацетилсерином с образованием цистеина [174, 225].

Не наблюдали рост *L. monocytogenes* при отсутствии в среде любого из витаминов: рибофлавина, биотина и тиамина [233]. В более поздних исследованиях существенными для роста листерий этого вида признаны рибофлавин, пантотенат кальция и липоевая кислота, а нормальному формированию колоний способствовали тиамин и биотин [225]. При конструировании питательных сред во избежание повышения концентрации факторов роста необходимо учитывать, что в агар-агаре, полученном из водорослей, могут присутствовать биотин и тиамин [178].

В качестве питательных основ в производстве микробиологических сред чаще всего используют сырье животного происхождения, как продукт наиболее богатый биологически ценными белками [5, 17, 51, 73]. Питательные среды с мясными гидролизатами, обеспечивают типичный рост при сравнительно небольших посевных дозах и не изменяют основные культурально-морфологические и биохимические свойства культивируемых микроорганизмов [7, 169]. Однако использование мясных гидролизатов в классических технологиях приготовления питательных сред увеличивают их себестоимость [123]. Кроме того, возникающие вопросы разработки технологии, стандартизации, оценки качества питательных сред из природного сырья имеют определенные трудности [21]. Это связано со снижением качества самого сырья (мясо, растительные объекты) ввиду сложной экологической обстановки в мире и антропогенным воздействием на окружающую среду. Поэтому сырье часто содержит антибиотики, химикаты, нитраты, токсические продукты, что отрицательно сказывается на инкубации и приросте биомассы микроорганизмов [24, 156].

Поэтому в производстве питательных основ и сред для культивирования микроорганизмов продолжается поиск альтернативного, экономически выгодного, стандартного и доступного сырья, богатого белками (отходы мясной, молочной, рыбной и птицеперерабатывающей промышленности) [64, 130].

В настоящее время мясные основы в большинстве случаев уступили место более рентабельному белковому сырью – рыбе и продуктам ее переработки. В большинстве случаев возможно заменить питательные основы, изготовленные из гидролизатов мяса, на гидролизаты из рыбной муки, без изменения ростовых свойств среды [142]. По этому пути пошли многие производители отечественных сухих питательных сред. Внимание исследователей было обращено к рыбе. По белковому составу оно незначительно отличается от мяса животных. Мясо рыб содержит 10-20 % белка, богатого незаменимыми аминокислотами, витамины, микро- и макроэлементы. Рыба является полноценным сырьем для производства белковых препаратов [20, 141].

При производстве листериозной диагностической сыворотки одним из этапов является получение биомассы листерий. Мировыми производителями (Becton Dickinson (США), Merck (Германия), Oxoid (Англия), Bio-Merieux (Франция), Pronadisa (Испания), Hi-Media (Индия) и др.) выпускаются питательные среды для выделения, обогащения и идентификации листерий, содержащие в своем составе селективные компоненты (хлористый литий, акрифлавина гидрохлорид, налидиксовая кислоты и т.д.), ингибирующие рост не только посторонней микрофлоры, но и значительно замедляющие рост самих листерий [104]. Кроме того, использование зарубежных питательных сред наших лабораториях ограничено из-за введенных экономических санкций в отношении РФ со стороны США и ряда других стран [143]. В связи с этим актуальным становится разработка технологии производства импортозамещающих питательных сред.

На отечественном рынке тремя производителями ФБУН ГНЦ ПМБ (п. Оболенск), ООО Научно-исследовательский центр фармакотерапии (г. Санкт-Петербург) и НПО «Питательные среды» (г. Махачкала) представлены несколько видов питательных сред для обогащения, выделения и идентификации листерий: питательный бульон для выделения листерий, питательный агар для выделения листерий, питательная среда для селективного выделения и идентификации листерий (Палкам-агар), питательная среда для выделения и культивирования листерий сухая, питательная среда для накопления листерий сухая, селективный бульон для обогащения листерий (бульон UVM), бульон Фрейзера, Оксфордский агар и полужидкая питательная среда для определения подвижности листерий.

Питательные среды для получения биомассы *L. monocytogenes* отсутствуют. В качестве источника белка рекомендовано использование панкреатических рыбных гидролизатов [104, 91, 138]. Ранее установлено, что биологические показатели и аминокислотный состав питательной среды для выделения листерий на основе панкреатического гидролизата сороги обеспечивают получение микробной массы с сохранением культурально-

морфологических и биохимических свойств листерий [129]. Сорога или плотва (лат. *Rutilus rutilus*) – вид лучепёрых рыб из семейства карповых, заселяет бассейн озера Байкал, является рыбой пониженной товарной ценности, поэтому её использование в качестве основы питательной среды экономически целесообразно [41, 56, 114].

Разработка питательной среды является важным этапом для получения биомассы листерий в производстве листериозной агглютинирующей сыворотки. Основным условием этого является сохранение S-формы выращиваемой культуры и получение ее в количестве, достаточном для иммунизации животных-продуцентов. Это обеспечивает получение высокоактивной специфичной гипериммунной стабильной листериозной агглютинирующей сыворотки, которая может быть использована для диагностики листериоза [100, 117].

1.6 Лабораторная диагностика листериоза

До начала 80-х годов XX в. выделение культур на питательных средах, окраска мазков из клинического материала, в сочетании с серологическими методами диагностики являлись основными методами лабораторной диагностики листериоза. Однако увеличение роста спорадических случаев и эпидемиологических вспышек способствовало необходимости усовершенствования диагностики данного заболевания [4, 128]. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) приняла меры по борьбе с этой опасной инфекцией и были введены методы контроля и диагностики *L. monocytogenes* по стандарту ISO (International Organization for Standardization, Международная организация по стандартизации). В РФ Министерством здравоохранения, Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору, также разработана и внедрена нормативно-техническая документация по выделению и идентификации *L. monocytogenes* [136].

Клинический диагноз листериоза устанавливают на основании комплекса эпидемиологического анамнеза, клинических признаков, патолого-анатомических и патологогистологических изменений с подтверждением результатов лабораторного исследования. Решающее значение принадлежит бактериологическому исследованию – выделению культуры листерий. Бактериологическая диагностика включает микроскопическое исследование исходного материала, посевы на питательные среды, идентификацию выделенных культур по культурально-морфологическим, биохимическим, молекулярно-биологическим и серологическим свойствам (ИФА, РА, РНГА, РСК, латекс-агглютинация), а также постановку биологической пробы на лабораторных животных [83, 84, 115].

Диагностика листериоза у людей представляет трудности в связи с многообразием клинических проявлений, отсутствием четких анамнестических и эпидемиологических данных, а также длительностью бактериологического исследования до 2-4 недель [29, 75].

Для лабораторного исследования у животных используют головной мозг, печень, селезенку, почки, пораженные участки легких, абортирванный плод или его оболочки. Для прижизненной диагностики берут выделения из половых органов абортировавших самок, молоко из пораженных долей вымени при наличии мастита – для бактериологического исследования; кровь или сыворотку крови от больных и подозрительных по заболеванию животных для серологического исследования.

При подозрении листериоза у людей исследуют слизь из носоглотки и зева – при ангинозной форме; отделяемое глаз – при глазной форме; кровь и ликвор – при сепсисе, менингитах и энцефалитах; меконий от новорожденных; околоплодную жидкость, плаценту, отделяемое родовых путей у женщин, родивших мертвых или больных детей, материал от новорожденных [49, 65, 75, 125]. Материалом для исследования на листериоз являются: продовольственное сырье, продукты животного происхождения и объекты окружающей среды (почва, фураж, подстилка, вода и т.д.) [87, 92].

Разработано множество методов, увеличивающих процент выделения листерий и ускоряющих процесс их идентификации [8].

В лабораторной диагностике используются экспресс-методы выявления *L. monocytogenes* с применением иммунохроматографических экспресс-тестов (Merk, Германия), иммуноферментной LOCATE(R) *Listeria* (R-Biopharm Rhone Ltd, Германия) и ПЦР тест-системы для определения ДНК *L. monocytogenes* (ПЦР технологии, ООО «НПО ДНК-технология», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Использование современных приборов баканализаторов miniVidas, Tempo (Biomerieux, Франция), BacTrac (SY-LAB Gerate GmbH, Австрия), Rabbit (Don Whitley Scientific, Великобритания), MALDI-TOF масс-спектрометрия (Bruker Daltonics, США), также сокращают время анализа. Однако положительные результаты ускоренных методов диагностики листерий не являются окончательными и требуют подтверждения бактериологическими и серологическими методами [45, 96, 108, 149].

Д.С. Батаевой и др. (2007) для определения *L. monocytogenes* применен ускоренный кондуктометрический метод на баканализаторе «БакТрак 4300». Одновременно проводили исследования иммуноферментным методом на анализаторе miniVIDAS с использованием теста VIDAS *L. monocytogenes* II (LM02). Для подтверждения принадлежности восьми выделенных культур к патогенному виду *L. monocytogenes* были использованы биохимические панели системы API *Listeria* (BioMerieux), позволившие идентифицировать в трех случаях *L. monocytogenes* и в 5 – *L. innocua*. При этом общая продолжительность исследования составила 3 дня, в том числе с применением баканализатора, *L. monocytogenes* определена через 24 часа, ИФА – в течение 70 мин [12].

В исследованиях Т.И. Карповой (2001) показано, что высокие результаты по дифференциации листерий получены с использованием теста API *Listeria* (BioMerieux). Однако API тест является экономически затратным для рутинной диагностики листериоза. Кроме того, использование только неко-

торых сахаров, входящих в «цветной ряд», не позволяло достоверно дифференцировать представителей рода *Listeria* до вида [53].

Одним из современных методов идентификации микроорганизмов является метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации MALDI-TOF. Вместе с тем в литературных источниках встречаются упоминания о том, что не всегда видовая идентификация бактерии рода *Listeria* методом MALDI-TOF проходит корректно. Возможно, это является следствием влияния различных факторов, таких как условия культивирования, состав питательных сред, а также уровень полиморфизма штаммов, взятых для исследований. К.В. Детушевым (2018) проведен сравнительный анализ точности идентификации при использовании двух способов пробоподготовки – метода прямого нанесения и метода экстракции белков муравьиной кислотой и ацетонитрилом с использованием 35 штаммов (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* и *L. seeligeri*). Независимо от метода нанесения принадлежность к роду *Listeria* была корректно установлена во всех образцах. Однако видовая идентификация при прямом нанесении была некорректна в девяти экспериментах, а при применении метода экстракции – в трех. Это объясняется тем, что отобранные для проведения работ штаммы представляют разнородную группу клинических изолятов, выделенных на территории РФ [38].

В современной лабораторной диагностике листериоза широко используется молекулярно-генетический метод, который значительно ускоряет процесс идентификации *L. monocytogenes* по сравнению с длительными бактериологическими исследованиями. Особое место среди этих методов занимает полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее варианты – гнездовая (или «вложенная») ПЦР, мультиплексная ПЦР и др. [45, 117, 181, 227]. Мультиплексная ПЦР позволяет одновременно амплифицировать несколько генов-мишеней. Для выявления бактерий рода *Listeria* и идентификации патогенного вида *L. monocytogenes* в настоящее время в качестве мишеней для ПЦР используют различные гены – 16S и 23S рРНК, *prs*, *gyrB*, *groB*, *hly*, *inlA*

и *inlB*, *plcA*, *iap* и др. [45,47, 53, 90, 117, 127, 150, 180, 188, 192, 223]. Использование этого метода позволяет выявить разнообразие *L. monocytogenes*, циркулирующих на разных географических территориях России с дифференциацией эпидемически значимых и опасных для человека штаммов [128].

Специфичность и высокая чувствительность ПЦР подтверждена в чрезвычайно широком спектре микроорганизмов, в том числе на патогенных листериях [2, 25, 26, 45, 90, 122]. Т.И. Карпова (2001) при анализе ПЦР штаммов листерий обнаружили слабый лизис у некоторых культур, вследствие чего возможно получение ложноотрицательного результата. В то же время ряд авторов сообщает о проведении ПЦР с использованием листериозных клеток, добавляемых в реакционную смесь без предварительной обработки литическими ферментами [159]. Недостаточный лизис связан со строением клеточной стенки и является штаммоспецифическим признаком [53].

Большинство иммунологических методов выявления листерий основано на применении моноклональных антител. Первая панель моноклональных антител для выявления листерий предложена J.M. Farber (1987). Метод выявлял общий флагеллярный H антиген листерий у *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. weishimeri* и *L. seeligeri* и не давал перекрестных реакций с 30 культурами других видов, включая стафилококки и стрептококки [163, 171]. Широкое применение получила родоспецифическая панель моноклональных антител, разработанная В.Т. Butman с соавторами (1988) [152]. В иммуноферментной реакции и дот-блоте моноклональные антитела не давали перекрестных реакций с 21 видом других микроорганизмов, включая стрептококки. Два моноклона из этой панели в дальнейшем использованы для создания коммерческой иммуноферментной тест-системы (*Listeria*-EeK) для выявления *Listeria* spp. [158]. Однако моноклональные, как и ранее использовавшиеся в методе иммунофлюоресценции поликлональные антитела, в настоящее время практически не применяются для диагностики листериоза [127, 128].

Однако все вышеперечисленные экспресс-методы имеют некоторые ограничения использования, связанные с необходимостью приобретения до-

рогостоящего импортного оборудования и расходных материалов, подготовки высококвалифицированного персонала, сложности постановки реакций и многочисленных контролей к ним, а иногда и недостаточной специфичности получаемых результатов [16, 133].

Этих недостатков лишены используемые в настоящее время серологические методы: реакция агглютинации (РА), реакция связывания комплемента (РСК), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), обладающие высокой чувствительностью и простотой исполнения [70, 127]. Результаты серологических исследований используют для постановки диагноза в комплексе с другими данными, а также при выявлении бессимптомных форм или переболевших листериозом людей и животных [75].

Вместе с тем, один из основоположников отечественной школы исследователей листериоза академик И.А. Бакулов (1967) обращал внимание на недостаточную специфичность серологических реакций для диагностики листериоза. Он считал, что серологические исследования должны проводиться с целью выявления бактерионосителей в неблагополучных по листериозу хозяйствах, где наличие заболевания установлено с помощью клинко-эпизоотологических и бактериологических исследований. Серологические исследования при листериозе являются вспомогательным средством, представляют ценность только в совокупности с клинической картиной и должны быть подтверждены бактериологическими исследованиями [9].

Таким образом, для достоверной лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, в том числе листериоза, необходимо проводить исследования с использованием бактериологических и серологических методов. Многие серологические реакции громоздкие и сложные, а методы их постановки малорезультативны. Поэтому весьма актуальной является проблема исследований по совершенствованию методов диагностики листериоза, созданию диагностических препаратов, обладающих высокой специфичностью, чувствительностью, информативностью, а также простых в исполнении и доступных широкому кругу исследователей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Штаммы

В работе при конструировании питательной среды для культивирования листерий (СКЛ), получении иммуногена и в контроле качества сыворотки листериозной агглютинирующей использовали штаммы ПБА III-IV групп патогенности (Таблица 1). В работе использовали 56 штаммов, в том числе 32 штамма *L. monocytogenes*, 18 штаммов *Listeria* spp. и 6 гетерологичных штаммов.

Таблица 1 – Штаммы микроорганизмов их производственное и экспериментальное назначение

Наименование штамма	Количество штаммов	Назначение
<i>L. monocytogenes</i> 766	1	– тест-штамм при конструировании среды СКЛ, – штамм для получения иммуногена, – контроль качества сыворотки листериозной, – изучение чувствительности сыворотки листериозной.
<i>L. monocytogenes</i>	31	– контроль качества сыворотки листериозной, – изучение чувствительности сыворотки листериозной.
<i>Listeria</i> spp.	18	– контроль качества сыворотки листериозной, – изучение специфичности сыворотки листериозной.
Гетерологичные штаммы: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Salmonella Enteritidis</i> Gartneri, <i>Salmonella Typhimurium</i> 21, <i>Shigella flexneri</i> 170, <i>Yersinia enterocolitica</i> O3 628/1	6	– контроль качества сыворотки листериозной, – изучение специфичности сыворотки листериозной.

Для получения корпускулярного антигена (далее иммуногена) и при конструировании питательной среды для культивирования листерий использован референс-штамм *L. monocytogenes* 766 (серологический вариант I), полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов

ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.

При изучении культурально-морфологических и биохимических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766 получены следующие результаты: рост на МПА с 1 % глюкозой – колонии круглые, мелкие полупрозрачные с четко очерченным гладким краем, рост на МПБ с 1 % глюкозой – равномерное помутнение без пленки. При микроскопии мазка просматриваются короткие грамположительные палочки с закругленными концами. Получен положительный каталазный тест. Видовая принадлежность *L. monocytogenes* 766 подтверждена MALDI-TOF масс-спектрометрическим анализом с использованием расширенной базы MALDI Biotyper 3,0 (Bruker Daltonics, США). Коэффициент соответствия Score value составил 2,241, что достоверно идентифицирует штамм до рода и вероятно – до вида.

Для контроля качества сыворотки листериозной агглютинирующей (далее сыворотка листериозная) и определения ее чувствительности использовали четыре штамма: *L. monocytogenes* 766, *L. monocytogenes* 3657, *L. monocytogenes* 156, *L. monocytogenes* 1588. Для определения специфичности сыворотки листериозной агглютинирующей взято два штамма *Listeria* spp.: *L. ivanovii* 97к-88 и *L. innocua* ба 304004, шесть гетерологичных штаммов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Enteritidis* Gartneri, *Salmonella Typhimurium* 21, *Shigella flexnery* 170, *Yersinia enterocolitica* O3 628/1.

Для изучения чувствительности сыворотки листериозной взято 28 штаммов: *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/ mxi, *L. monocytogenes* 766/ П.

Для изучения специфичности сыворотки листериозной применены 16 штаммов *Listeria* spp.: *L. grayi* ATCC25400, *L. grayi* МКМ2, *L. grayi* ИП, *L. innocua* ATCC33090, *L. innocua* В-64, *L. innocua* М4, *L. ivanovii* ATCC19119, *L. ivanovii* 7842, *L. ivanovii* 11840, *L. seeligeri* ATCC35967, *L. seeligeri* SLSC5981, *L. seeligeri* LSC3954, *L. welschimerii* В-107, *L. welschimerii* 4911, *L. welschimerii* Ярославль 3, *L. murrayi* G-44 и 6 гетерологичных штаммов: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. Typhimurium* 21, *Sh. flexneri* 170, *Y. enterocolitica* ОЗ 628/1.

Апробация сыворотки листериозной проведена ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск) с использованием в работе штаммов, полученных из коллекции патогенных микроорганизмов этого учреждения.

2.2 Питательные среды

В период с 2009 по 2022 гг. произведено в научно-производственном отделе ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора четыре экспериментальных серий сухой питательной среды для культивирования листерий (СКЛ) в количестве 2 кг.

При исследовании среды СКЛ 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).

Штамм *L. monocytogenes* 766, для пролущения иммуногена, культивировали во флаконах с питательной средой СКЛ при температуре 37 ± 1 °С в течение 24 ч.

Для определения чувствительности и специфичности сыворотки листериозной штаммы *L. monocytogenes* и *Listeria* spp. культивировали на МПБ с 1 % глюкозой и на среде СКЛ. Гетерологичные штаммы инкубировали на бульоне Хоттингера (pH 7,2) и на агаре Хоттингера (pH 7,2).

2.3 Лабораторные животные-продуценты

В качестве лабораторных животных-продуцентов сыворотки листериозной использовали 455 кроликов породы шиншилла (*Chinchilla*), живой массой $2,75 \pm 0,5$ кг, без предъявления требований к полу, полученных из лаборатории подопытных животных ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Для проведения работы выбрали животных с хорошо выраженными ушными краевыми венами, без признаков клинических заболеваний, а также травматических повреждений кожи и конечностей. Протоколы экспериментов на животных одобрены Комитетом по биоэтике (Протокол № 5 от 29.11.2022 г.).

Работу с животными проводили согласно ГОСТ 34088-2017 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными» (01.08.2018 г.); директивой 2010/63/ЕИ Европарламента европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях; международным рекомендациям (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (CIOMS, Geneva, 1985); Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986 г.); решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 79 «Об утверждении правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза»; Минздрава РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

2.4 Сыворотка листериозная агглютинирующая

В период 2009-2022 гг. на базе ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора получено 10 экспериментально-производственных серий сыворотки листериозной агглютинирующей (в объеме 7,52 л) (Таблица 2).

Таблица 2 – Производство сывороток листериозных агглютинирующих

№ п/п	Серия	Дата изготовления	Объем, л
1	34	28.09.2009 г.	0,7
2	35	18.12.2009 г.	0,9
3	40	18.03.2011 г.	1,3
4	41	15.04.2015 г.	0,45
5	42	17.04.2015 г.	0,5
6	43	05.10.2016 г.	0,5
7	44	28.02.2018 г.	0,8
8	45	14.03.2019 г.	0,6
9	46	26.11.2019 г.	0,55
10	47	15.01.2021 г.	0,62
	48	15.01.2021 г.	0,6
Итого:	11		7,52

2.5 Приготовление панкреатических гидролизатов из белкового сырья

Для получения 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 (КРС).

При получении ПГ использовали метод разработанный в ФБУН ГНЦ ПМБ [40], для этого рыбу и кальмара, не очищая от внутренностей и чешуи резали на крупные куски, взвешивали и промывали проточной водой. Заливали дистиллированной водой из расчета 1,5 л на 1 кг сырья и кипятили в течение 30 минут. Далее вынимали из бульона, измельчали и взвешивали. В стеклянные бутылки закладывали сырье и заливали бульоном, охлажденным до 50 ± 5 °С, устанавливали pH 8,2 с помощью 40 % раствора натрия гидроксида (NaOH) [40]. Затем добавляли измельчённую поджелудочную железу КРС (1 %) и хлороформ (1 %) к имеющемуся объему (Таблица 3).

Таблица 3 – Состав смеси панкреатических гидролизатов из рыбного сырья и морепродукта

Сырье	Вес, кг	Бульон, л	Поджелудочная железа КРС, кг	Хлороформ, л
Сельдь	0,88	1,320	0,015	0,015
Минтай	0,75	1,125	0,013	0,013
Сорога	0,74	1,110	0,013	0,013
Кальмар	0,52	1,040	0,012	0,012

Ежедневно определяли содержание аминного азота формольным титрованием и значение рН гидролизатов исследовали потенциометрическим методом в течение всего срока гидролиза по МУК 4.2.2316-08 [80].

Высушивали ПГ в сублимационной установке LP10R (Ilshin, Корея). Замораживание препаратов проводили в течение 4 ч при температуре -45 ± 5 °С, при этом температура гидролизатов составляла -43 ± 3 °С. Параметры сублимационной сушки: температура конденсатора -65 ± 5 °С, давление от 16 до 4 Па, температура препарата от -43 ± 3 до 30 ± 2 °С. Высушивание длилось 42 ± 2 ч.

2.6 Ядерная магнитно-резонансная спектроскопия (ЯМР-спектроскопия) панкреатических гидролизатов

Качественное определение аминокислотного состава сухих ПГ сельди тихоокеанской, минтая, сороги и кальмара европейского проводили методом ЯМР-спектроскопии совместно с ФГБУН Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН. Определяли три спектра ЯМР – ^1H (400,1 МГц), ^{13}C (100,6 МГц), ^{15}N (40,5 МГц). Спектры записывали на спектрометрах «Bruker DPX400» (^{13}C) и «Bruker AV400» (^1H и 2M) (Bruker, Германия) без использования дейтерированных растворителей.

2.7 Физико-химические методы исследования питательной среды для культивирования листерий

Для изучения 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. Определения проводили согласно требованиям МУК 4.2.2316-08 [80].

2.8 Биологические методы исследования питательной среды для культивирования листерий

Специфическую активность питательных сред (показатель прорастания, чувствительность и эффективность среды; скорость роста, культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства микроорганизма) проверяли в соответствии требованиям МУК 4.2.2316-08 [80] с использованием тест-штамма *L. monocytogenes* 766. Подсчет колоний микроорганизмов проводили на счетчике колоний микроорганизмов СКМ-2 (Stegler, Китай).

2.8.1 Определение чувствительности и скорости роста *L. monocytogenes* 766 на питательной среде для культивирования листерий

Чувствительность питательной среды определяли с помощью максимального разведения культуры, обеспечивающего визуально обнаруживаемый рост колоний тест-штамма *L. monocytogenes* 766 в течение определенного времени и температуры на всех засеянных чашках с питательной средой.

Скорость роста (ч) определяли по минимальному времени инкубации посевов, за которое при соответствующем разведении обеспечивается отчетливый видимый невооруженным глазом рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766 на питательной среде в чашках Петри.

Для определения чувствительности и скорости роста на испытуемой питательной среде для культивирования листерий использовали тест-штамм

L. monocytogenes 766. Для восстановления музейного тест-штамма использовали два пассажа – I и II.

I пассаж. Ампулы с лиофилизированной культурой *L. monocytogenes* 766 вскрывали и вносили по 0,3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, далее высевали в пробирки с МПБ с 1 % глюкозой и инкубировали при температуре 37 ± 1 °С в течение 24 часов.

II пассаж. Выросшую бульонную культуру пересевали на чашки Петри с МПА с 1 % глюкозой и инкубировали при температуре 37 ± 1 °С в течение 24 часов.

Затем готовили микробную взвесь культуры *L. monocytogenes* 766 в 0,9 % растворе натрия хлорида, которая должна соответствовать 10 МЕ по отраслевому стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО мутности 10 МЕ), эквивалентную концентрации $0,93\times 10^9$ м.к./мл по общепринятой методике. После 10-и кратного титрования микробную взвесь засевали по 0,1 мл из разведений 10^{-6} и 10^{-7} по три повторности на чашки Петри с испытуемой СКЛ и контрольной средой (МПА с 1 % глюкозой). Посевы инкубировали в течение 48 ч при 37 ± 1 °С. Учет результатов проводили через 18, 24 и 48 ч.

2.8.2 Определение показателя эффективности питательной среды для культивирования листерий

Эффективность среды определяли согласно требованиям МУК 4.2.2316-08 [80] по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды (в млрд./мл) и прироста числа микроорганизмов относительно засеянного (показатель эффективности).

Подготовка тест-штамма *L. monocytogenes* 766 проводили согласно методике, изложенной в п. 2.8.1. Выросшую культуру *L. monocytogenes* 766 смывали 0,9 % раствором натрия хлорида (NaCl) и готовили микробную взвесь по ОСО мутности 10 МЕ, далее разводили двухкратно 0,9 % раствором натрия хлорида, что соответствовало 500 млн. м.к./мл. Затем по 0,1 мл этой культуры засевали в пробирки с 5 мл скошенного агара исследуемых

сред (СКЛ, ГРМ-агар, МПА с 1 % глюкозой) без столбика по две повторности.

Через 20 ч культивирования при температуре 37 ± 1 °С микробную массу полностью смывали с поверхности агара 2,5 мл 0,9 % раствором натрия хлорида и доводили по ОСО мутности до 10 МЕ. Учитывая добавленный объем 0,9 % раствора натрия хлорида, определяли выход микробных клеток (млрд) с 1 мл среды.

Показатель эффективности (млрд/мл) питательной среды выражали в расчете на количество выросших микробных клеток тест-штамма.

2.9 Метод перевиваемых культур

При изучении биологических свойств СКЛ в качестве контроля использовали питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар, ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск) и МПА с 1 % глюкозой (п. 5.12 ГОСТ 10444.1-84) [35].

Изучение биохимических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766 проводили по требованиям ГОСТ 32031-2012 [36] и определителю Берджи [95] с использованием сред Гисса (п. 5.29 ГОСТ 10444.1-84) [35].

Подготовку тест-штамма *L. monocytogenes* 766 проводили по ранее изложенной методике. Далее культуру пересекали в пробирки со средами хранения – СКЛ, ГРМ-агар и с МПА с 1 % глюкозой. После инкубации при температуре 37 ± 1 °С в течение 48 ч посеvy помещали в холодильник на длительный (12 мес) при температуре 6 ± 2 °С. Через 3, 6, 9 и 12 мес хранения тест-штамм *L. monocytogenes* 766 высевали на МПБ с 1 % глюкозой, после чего посеvy инкубировали 48 ч при температуре 37 ± 1 °С, затем пересекали на МПА с 1 % глюкозой и инкубировали в тех же условиях, готовили микробную взвесь по ОСО мутности 10 МЕ. Далее готовили серийные разведения микробной взвеси до 10^{-7} . Затем засевали по 0,1 мл культуры из разведений 10^{-6} и 10^{-7} по три повторности с соответствующей питательной средой. Посевы инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 ± 1 °С.

Специфическую активность питательных сред (показатель прорастания, чувствительность и эффективность среды; скорость роста, культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства микроорганизма) оценивали комплексом микробиологических методов в соответствии требованиям МУК 4.2.2316-08 [80].

2.10 Методы изучения иммуногена

2.10.1 Способ получения иммуногена

Для иммунизации кроликов-продуцентов использовали корпускулярный антиген (далее иммуноген) полученный из штамма *L. monocytogenes* 766.

Для получения иммуногена, штамм *L. monocytogenes* 766 культивировали во флаконах на скошенной среде СКЛ при температуре 37 ± 1 °C в течение 24 часов. Бактериальную массу смывали забуференным физиологическим раствором pH 7,2 (ЗФР), определяли концентрацию микробных клеток по ОСО мутности 10 МЕ. Полученную микробную взвесь инактивировали кипячением при температуре 100 °C в течение 1 ч.

Специфическую стерильность иммуногена проверяли согласно требованиям МУК 4.1/4.2.588-96 [81]. Иммуноген высевали по 0,3 мл в пробирки с МПБ с 1 % глюкозой и по 0,1 мл на чашки Петри с МПА с 1 % глюкозой. Посевы инкубировали при 37 ± 1 °C в течение 6 сут с ежедневным просмотром. Затем с МПБ с 1% глюкозой, после трёх суток инкубации, делали посевы на две чашки с МПА с 1 % глюкозой с последующей инкубацией до трёх суток.

2.10.2 Определение белка в иммуногене по методу Лоури

Содержание белка в иммуногене определяли по методу Лоури (1951) с применением бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США) в качестве стандарта [184].

2.10.3 Определение общего содержания углеводов в иммуногене в реакции с фенолом

Общее содержание углеводов определяли по методике Р. Хансона и Дж. Филлипса, с использованием фенольного реактива и концентрированной

серной кислоты (H_2SO_4), в качестве стандарта применяли глюкозу [76].

2.10.4 Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот в иммуногене

Определение суммарного содержания нуклеиновых кислот осуществляли по методу А.С. Спирина (1958). Для этого проводили экстракцию их из исследуемого материала горячей хлорной кислотой (HClO_4) с последующим определением поглощения экстрактов в ультрафиолетовой области спектра при длинах волн 270 и 290 нм на спектрофотометре NanoPhotometer P 330 (Implen, Германия) [121].

2.11 Серологические методы

Для определения чувствительности и специфичности полученной экспериментальной сыворотки листериозной использовали методы ориентировочной (ОРА) и развернутой (РРА) реакций агглютинации с культурами *Listeria* spp. и гетерологичными штаммами.

2.11.1 Постановка ориентировочной реакции агглютинации

В чашку Петри вносили 0,03 мл сыворотки листериозной в разведении 1:50 и такое же количество 0,9 % раствора натрия хлорида (контроль культуры и сыворотки). Петлёй или стеклянной палочкой исследуемую культуру равномерно смешивали сначала с каплей 0,9 % раствора натрия хлорида, затем с сывороткой в разведении 1:50. Для ускорения выпадения агглютината производили легкое покачивание чашки Петри. Учет результатов ОРА проводили в течение 3 мин. Результаты ОРА считали положительными при появлении четко выраженного агглютината (образование хлопьев) в капле с сывороткой и при ее отсутствии в контроле.

Положительный результат ОРА свидетельствовал о наличии в исследуемом материале антигена. При отрицательном результате, так же, как и в контроле с 0,9 % раствором натрия хлорида микробная взвесь оставалась равномерно мутной без агглютината и хлопьев.

2.11.2 Постановка развернутой реакции агглютинации

Содержимое ампулы с сывороткой листериозной растворяли в 1 мл стерильной дистиллированной воды. Сыворотку переносили в пробирку с 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (рН 7,2), получали разведение 1:10. Для постановки РА использовали разведение исследуемой сыворотки 1:50, в пробирку вносили 4 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 1 мл сыворотки (1:10), последовательно титровали до разведения 1:400. После добавления микробной взвеси исследуемой культуры по 0,5 мл к 0,5 мл каждого разведения сыворотки, получали конечные разведения сывороток от 1:100 до 1:800. Одновременно ставили контроль антигена (0,5 мл микробной взвеси и 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида) и контроль сыворотки (0,5 мл сыворотки листериозной в разведении 1:50 и 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида). Штативы с пробирками тщательно встряхивали, выдерживали 2 ч при температуре 37 ± 1 °С и 18-22 ч при температуре 21 ± 1 °С.

Учёт результатов в РРА проводили через 21 ч по четырёхкрестовой схеме: 4 креста – крупно- или мелкозернистая агглютинация при полном просветлении жидкости; 3 креста – крупно- или мелкозернистая агглютинация при легкой опалесценции жидкости; 2 креста – слабая мелкозернистая агглютинация на фоне мутной жидкости; 1 крест – следы агглютинации на фоне мутной жидкости. «—» – отрицательная, отсутствие просветления и зонтика. Реакция считалась положительной на 3-4 креста. Реакция на 1-2 креста не учитывалась.

2.12 Определение прозрачности, цветности и кислотности сыворотки листериозной

Прозрачность и цветность измеряли с применением колориметра фотоэлектрического концентрационного (ЗОМЗ, Россия) при длинах волн 400 и 500 нм, соответственно. Изучение рН проводили потенциометрическим методом на рН-метре 7310Р (WTW, Германия). Определение прозрачности, цветности и рН сыворотки листериозной выполняли согласно требованиям

МУК 4.1/4.2.588-96 [81].

2.13 Подготовка штаммов микроорганизмов для определения чувствительности и специфичности сыворотки листериозной

Ампулы с лиофилизированными штаммами *L. monocytogenes* и *Listeria* spp. вскрывали и вносили по 0,3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. После растворения микробную взвесь культур высевали на МПБ с 1 % глюкозой и инкубировали при 37 ± 1 °С в течение 24 ч. Далее пересевали среду СКЛ и инкубировали при 37 ± 1 °С в течение 24 ч.

Культуры гетерологичных штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. Typhimurium* 21, *Sh. flexneri* 170, *Y. enterocolitica* ОЗ 628/1, предварительно разведённые в 0,3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида высевали на бульон Хоттингера (рН 7,2) (п. 5.20, ГОСТ-10444.1) инкубировали при 37 ± 1 °С в течение 24 ч. Далее пересевали на агар Хоттингера (рН 7.2) (п. 5.20.3 ГОСТ-10444.1) с последующей инкубацией при 37 ± 1 °С в течение 24 ч [35].

2.14 Стерилизующая фильтрация сыворотки листериозной

После внесения и растворения стабилизаторов – тиосульфата натрия и сахарозы, сыворотку листериозную фильтровали через фильтр Sartobran (Sartorius, Германия) под давлением 55 ± 5 кПа ($0,55 \pm 0,5$ атм.). Сыворотку хранили при температуре 6 ± 2 °С.

2.15 Испытания стабильности сыворотки листериозной и установление срока годности

Изучение стабилизации сыворотки листериозной агглютинирующей. Для стабилизации сыворотки листериозной по сохранению ее исходных свойств использовали четыре препарата, обладающие стабилизирующим действием в различных концентрациях: сорбит – 2,5 %, поливинилпирролидон – 1 %, сахароза – 3 % и тиосульфат натрия – 1 %.

Для определения стабильности использовали изотермический тест на «ускоренное старение» антител сыворотки листериозной на 50 % при температуре 60 °С по методу Р. Jameson [179]. Для этого, экспериментальные серии сывороток листериозных запаиваемые в ампулы закладывали в лабораторный инкубатор (Friocell, Чехия) при температуре хранения 60 °С на 50 сут. Выемку образцов сывороток листериозных (серии 41, 42 и 43) проводили через каждые 5 сут. Далее ампулы хранили в холодильнике при температуре 6 ± 2 °С. По окончании испытания одновременно определяли титр антител испытуемых серий сывороток листериозных в РРА.

Долгосрочные испытания стабильности

Для исследования долговременной стабильности лиофилизированную сыворотку листериозную серий 41, 42 и 43 запаиваемую в ампулах закладывали на хранение в холодильник при температуре 6 ± 2 °С. Один раз в год проводили выемку по два образца сыворотки листериозной из каждой серии. Далее определяли основные параметры сыворотки листериозной: внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность, рН, чувствительность и специфичность.

Испытания стабильности методом «ускоренного старения»

Для определения стабильности и сроков хранения сыворотки листериозной использовали множественный изотермический тест по методу Р. Jameson [179]. Метод основан на создании неблагоприятных условий хранения МИ и применяется для прогнозирования срока хранения. Исследование проводили в условиях высоких температур от 60 до 90 °С для установления и подтверждения срока годности сыворотки листериозной. Экспериментальные серии сыворотки листериозной выдерживали при температурах 60, 70, 80 и 90 °С в течение 50 сут в лабораторном инкубаторе (Friocell, Чехия).

Для определения качественных показателей сыворотки листериозной определяли основные параметры: внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность, рН, чувствительность и специфичность.

2.16 Определение эффективности сыворотки листериозной для идентификации возбудителя листериоза

Ампулы с лиофилизированными культурами *L. monocytogenes* и *Listeria* spp. (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welschimerii*, *L. murrayi*) вскрывали и вносили по 0,3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. После растворения микробную взвесь культур высевали на МПБ с 1 % глюкозой и инкубировали при 37 ± 1 °С в течение 24 ч. Далее пересевали на две чашки Петри со средой СКЛ и инкубировали при 37 ± 1 °С в течение 24 ч. Лиофилизированные культуры гетерологичных микроорганизмов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. Typhimurium* 21, *Sh. flexneri* 170, *Y. enterocolitica* O3 628/1, предварительно разведённые в 0,3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида высевали на бульон Хоттингера (рН 7,2) (п. 5.20 ГОСТ-10444.1) инкубировали при 37 ± 1 °С в течение 24 ч. Далее пересевали на две чашки Петри с агаром Хоттингера (рН 7,2) (п. 5.20.3 ГОСТ-10444.1) с последующей инкубацией при 37 ± 1 °С в течение 24 ч.

Чувствительность полученной сыворотки листериозной определяли в РРА и ОРА с 26 штаммами *L. monocytogenes*; на специфичность – 22 штаммами *Listeria* spp. и гетерологичными микроорганизмами. Антигены готовили в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по ОСО мутности 10 МЕ. Учёт результатов в РРА проводили через 21 ч по четырёхкрестовой схеме: 4 креста – крупно- или мелкозернистая агглютинация при полном просветлении жидкости; 3 креста – крупно- или мелкозернистая агглютинация при легкой опалесценции жидкости; 2 креста – слабая мелкозернистая агглютинация на фоне мутной жидкости; 1 крест – следы агглютинации на фоне мутной жидкости. «–» – отрицательная, отсутствие просветления и зонтика. Реакция считалась положительной на 3-4 креста в разведении 1:400. Учет результатов ОРА считали положительной при появлении мелко- или крупнозернистого агглютината, ясно видимого невооруженным глазом в течение 3 мин.

Диагностическую эффективность определяли расчетом нижней границы доверительного интервала по показателям чувствительности и специфич-

ности с использованием метода Фишера [74] со статистической надежностью 95 %.

2.17 Статистические методы

Полученные результаты обрабатывали 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. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. При оценке антигенных свойств сыворотки листериозной титры антител выражали в средних арифметических величинах по Е.В. Монцевичюте-Эрингене [79], а средний геометрический показатель титра антител по Е.П. Тамбовцеву [126].

ГЛАВА 3. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИСТЕРИЙ

При конструировании питательных сред учитываются потребности культивируемого микроорганизма. В процессе роста и размножения микроорганизм должен получать питательные вещества, в первую очередь – белки в низкомолекулярной форме, предварительно подвергшиеся воздействию ферментов [40]. В настоящее время мясные основы в большинстве случаев уступили место более рентабельному белковому сырью – рыбе и продуктам ее переработки. Мясо рыб содержит 10-20 % белка, богатого незаменимыми аминокислотами, витаминами, микро- и макроэлементами [20]. Ферментативный гидролиз проводится под действием протеолитических ферментов в условиях щадящей температуры 45 ± 2 °С, что способствует сохранению питательных веществ (аминокислот, витаминов и т.д.). В качестве источника протеолитических ферментов применяют измельченную поджелудочную железу КРС, содержащую комплекс ферментов (пепсин, панкреатин, трипсин и т.д.). На активность процесса гидролиза влияют: температура, кислотность среды, время воздействия, концентрация и способ внесения фермента [40, 141].

3.1 Физико-химические показатели панкреатических гидролизатов

В процессе приготовления панкреатических гидролизатов из рыбного сырья (сельдь, минтай, сорога) и морепродукта (кальмар), потеря в массе составила: 56,5 % у кальмара и 19,5-38,5 % у всех видов рыб.

Аминный азот. Определяющим процессом в ходе ферментативного гидролиза является накопление низкомолекулярных продуктов белковой деградации. Оценку эффективности панкреатического гидролиза проводили по степени накопления свободных аминогрупп и аминокислот (аминного азота) в полученном продукте.

Динамику ферментативного гидролиза наблюдали по нарастанию аминного азота. Полученные данные представлены на рисунке 1.

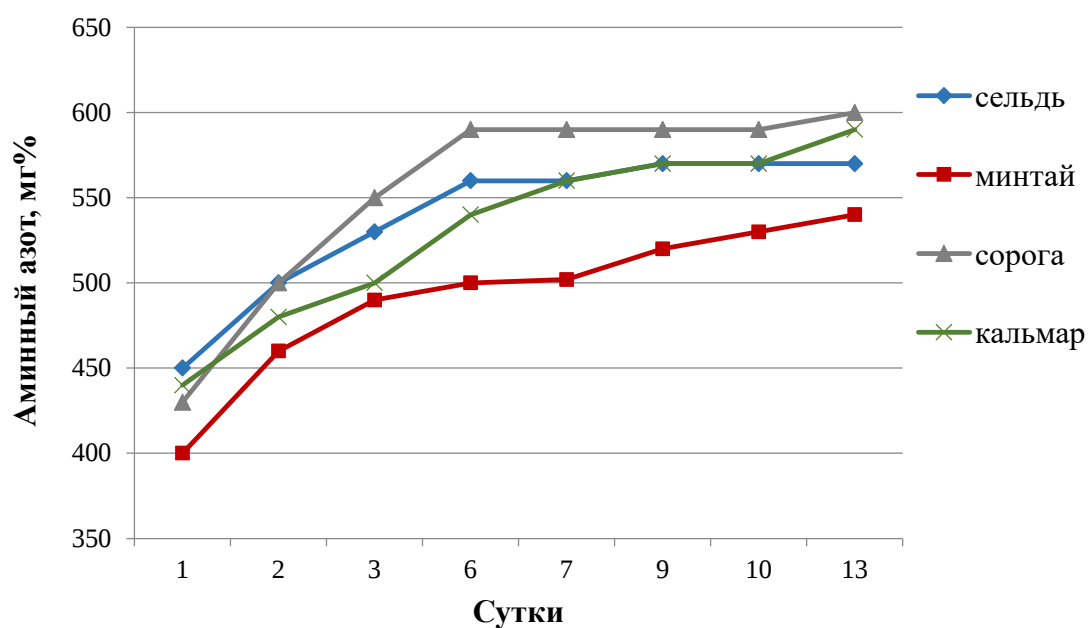


Рисунок 1 – Динамика накопления аминного азота в панкреатических гидролизатах сельди, минтая, сороги и кальмара, мг%

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%). В дальнейшем, 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.

В ходе проведенного исследования установлено, что во всех образцах содержание аминного азота увеличивалось в течение первых 3 сут в среднем на $90,0 \pm 20$ мг% и 6 сут на $120,0 \pm 20$ мг% по сравнению с первыми сутками ферментализации, а затем отмечалась стабилизация значений степени гидролиза (в среднем увеличение на 25,0 %). Наибольшее содержание аминного азота в конце ферментативного гидролиза определено в ПГ сороги – $600,0 \pm 10$ мг%, данный показатель интенсивно нарастал к 6 сут, что говорит о быстрой фазе гидролиза и далее оставался стабильным в течение 7 сут (7-13 сут). Наименьшие показания аминного азота отмечены в гидролизате минтая

(540 ± 10 мг%), что в 1,1 раза меньше по сравнению с показаниями аминного азота ПГ сороги.

Во всех полученных ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара наблюдали увеличение содержания аминного азота на 6 сут (в среднем до $547,5 \pm 27,5$ мг%), что свидетельствовало о высокой степени расщепления белка. Стабилизация содержания аминного азота свидетельствовала об окончании ферментативного процесса.

Кислотность. На первые сутки гидролиза кислотность ПГ достигала в среднем $6,83 \pm 0,07$, по окончании трех суток ее прирост составил 6,88 %. Определено, что в гидролизате сороги значения рН оставались стабильными с 6 до 13 сут. В гидролизате сельди значения рН с 6 по 13 сут близки к нейтральным (рН 7,2), а в гидролизатах кальмара и минтая после 3 сут гидролиза значение рН слабощелочное (от 7,4 до 7,7), что вероятнее всего связано с особенностями исходного сырья (Рисунок 2).

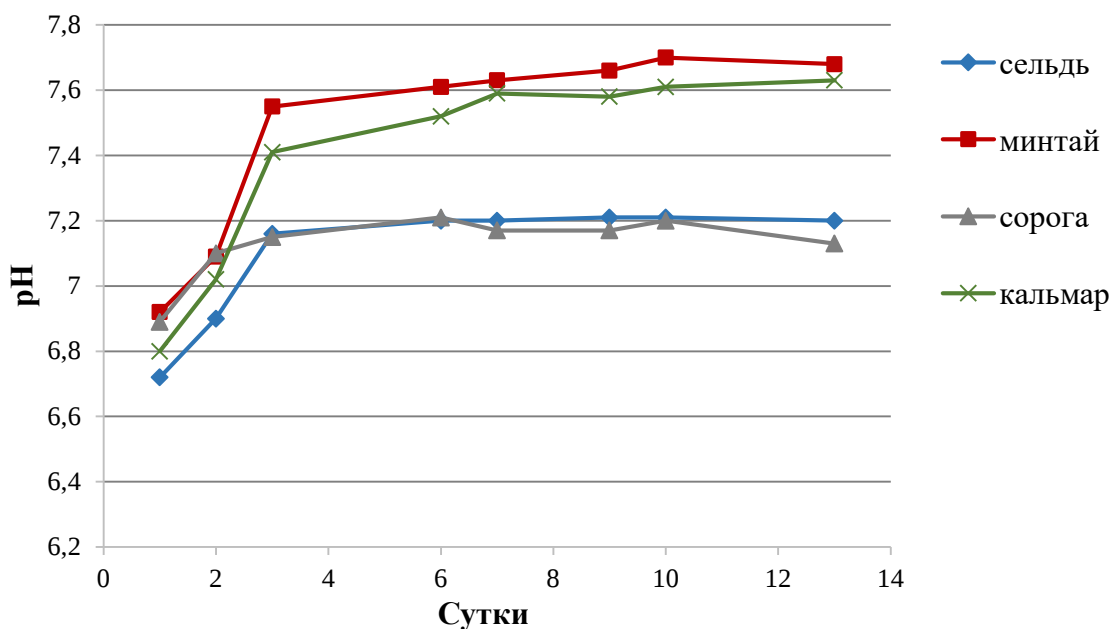


Рисунок 2 – Изменение значений рН в панкреатических гидролизатах сельди, минтая, сороги и кальмара

По истечении времени гидролиза ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара фильтровали через ватно-марлевый фильтр.

Для получения сухого рыбного гидролизата, нами выбрана сублимационная сушка с фазовым переходом «лед-пар», которая обеспечивает длительную сохранность химического состава препарата [48]. Ферментативные гидролизаты сельди, минтая, сороги и кальмара замораживанию при температуре полок -45 ± 5 °С в течение 4 ч, температура гидролизатов составляла -43 ± 3 °С. Параметры сублимационной сушки: температура конденсатора -65 ± 5 °С, давление от 16 до 4 Па, температура препарата от -43 ± 3 до 30 ± 2 °С. Высушивание длилось 42 ± 2 ч. Во время сушки ПГ сельди на этапе вымораживания образовалась жировая пленка, в результате чего продолжительность высушивания увеличилась в 2 раза. Данные о выходе сухих панкреатических гидролизатов показаны в таблице 4.

Таблица 4 – Выход ПГ после фильтрации и лиофильной сушки

Наименование гидролизата	Выход жидкого гидролизата, л	Выход сухого гидролизата, кг	Показатель аминного азота, %
ПГ сельди	1,2	0,067	5,7
ПГ минтая	1,0	0,065	5,3
ПГ сороги	1,0	0,063	6,0
ПГ кальмара	1,0	0,067	5,8

Высушенные ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара представляли собой мелкодисперсные, гигроскопические порошки светло-желтого цвета. В дальнейшем сухие ПГ использовали в качестве белковой основы в составе питательных сред для культивирования листерий.

Методом ЯМР-спектроскопии определили качественный состав ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара. Они содержали 12 свободных аминокислот – аланин, валин, треонин, аргинин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, глицин, доли гистидина, тирозина, триптофана составили менее 5,0 %.

3.2 Изучение ростовых свойств *L. monocytogenes* 766 на питательных средах с добавлением панкреатических гидролизатов

Для проверки ростовых свойств питательной среды для культивирования листерий на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара использовали тест-штамм *L. monocytogenes* 766.

Сконструированы четыре варианта экспериментальных питательных сред на основе сухих ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара, pH $7,2 \pm 0,2$. В качестве контрольной среды использовали питательную среду МПА с 1 % глюкозой (Таблица 5). Во всех экспериментальных питательных средах наблюдали слабую опалесценцию.

Таблица 5 – 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			

Определены основные биологические свойства тест-штамма *L. monocytogenes* 766 культивируемого на экспериментальных питательных средах на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара по культуральным, морфологическим, серологическим и биохимическим свойствам (Таблица 6).

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 °C отмечали типичный рост

колоний в S-форме тест-штамма *L. monocytogenes* 766, достаточный для визуального подсчета колоний ($d=1,0-1,5$ мм).

Таблица 6 – Биологические свойства тест-штамма *L. monocytogenes* 766 на питательных средах на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара

Питательная среда	Культуральные свойства	Время инкубации, ч	Морфологические свойства	Серологические свойства в ОРА (1:100)	Биохимические свойства
Вариант № 1 ПГ сельди	«росинчатый» рост	18	короткие Гр+ палочки с закругленными концами	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)
	типичные колонии S-форма $d=1,0-1,2$ мм	24			
	типичные колонии S-форма $d=3,0-3,5$ м	48			
Вариант № 2 ПГ минтая	рост не обнаружен	18	короткие Гр+ палочки с закругленными концами	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)
	«росинчатый» рост $d < 1,0$ мм	24			
	типичные колонии S-форма $d=2,5-3,0$ мм	48			
Вариант № 3 ПГ сороги	«росинчатый» рост	18	короткие Гр+ палочки с закругленными концами	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)
	типичные колонии S-форма $d=1,0-1,5$ мм	24			
	типичные колонии S-форма $d=3,0-4,0$ мм	48			
Вариант № 4 ПГ кальмара	рост не обнаружен	18	короткие Гр+ палочки с закругленными концами	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)
	«росинчатый» рост $d < 1,0$ мм	24			
	типичные колонии S-форма $d=2,0-2,5$ мм	48			
МПА с 1 % глюкозой	рост не обнаружен	18	короткие Гр+ палочки с закругленными концами	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)
	«росинчатый» рост $d < 1,0$ мм	24			
	типичные колонии S-форма $d=1,0$ мм	48			

Примечание: d – диаметр колоний, Гр+ – грамположительные

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. 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) во всех вариантах исследуемых сред.

Проведена оценка специфической активности сконструированных четырех вариантов питательных сред по прорастанию, чувствительности и скорости роста микроорганизма, эффективности среды (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты изучения специфической активности питательных сред на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара

Питательная среда	Показатель прорастания микроорганизма, %	Чувствительность, КОЕ	Скорость роста, ч	Доля диссоциации, %	Эффективность питательной среды, м.к./мл
	разведение 10^{-6} (100 м.к.)	разведение 10^{-7} (10 м.к.)			
Вариант № 1 ПГ сельди	–	–	18	0	$3,8 \times 10^9$
	–	$6,0 \pm 1,1$	24		
	$100,0 \pm 1,8$	$7,0 \pm 1,1$	48		
Вариант № 2 ПГ минтая	–	–	18	0	$2,6 \times 10^9$
	–	–	24		
	$100,0 \pm 1,4$	$8,0 \pm 0,4$	48		
Вариант № 3 ПГ сороги	–	–	18	0	$4,7 \times 10^9$
	–	$9,0 \pm 0,4$	24		
	$112,0 \pm 1,6$	$10,0 \pm 0,4$	48		
Вариант № 4 ПГ кальмара	–	–	18	0	$1,9 \times 10^9$
	–	–	24		
	$99,0 \pm 1,8$	$7,0 \pm 1,1$	48		
МПА с 1 % глюкозой	не рассчитывали	–	18	0	$2,8 \times 10^9$
		–	24		
		$8,3 \pm 1,5$	48		

Примечание: «–» – подсчет колоний не проводили

По прорастанию тест-штамма *L. monocytogenes* 766 из разведения 10^{-6} при культивировании в течение 48 ч высокие результаты показала питатель-

ная 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 испытываемых средах в четырех вариантах показало стабильность сохранения его основных биологических свойств.

Эффективность экспериментальных питательных сред вариантов № 1, 2, 3 и 4 определена через 20 ч инкубации (Рисунок 3).

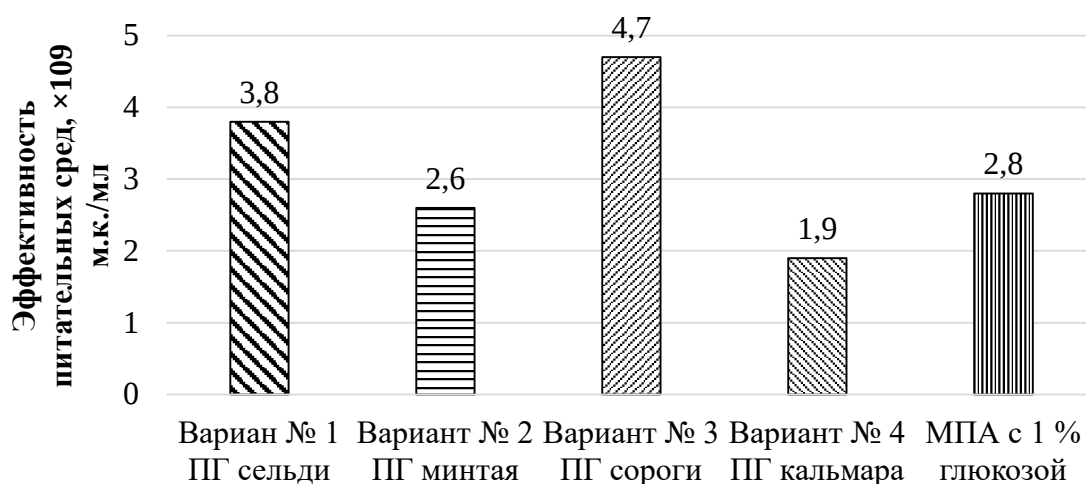


Рисунок 3 – Эффективность экспериментальных питательных сред на основе ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара

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.

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).

3.3 Конструирование питательной среды для культивирования листерий и изучение ее ростовых свойств

При конструировании питательных сред, для улучшения качественных характеристик, их состав дополнительно обогащают ферментативными гидролизатами. Изучен аминокислотный состав питательных основ панкреатических гидролизатов сороги и отходов производства мясной воды (ГОПМВ). Количественное содержание аминокислот измеряли на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-881 (Чехия) (Таблица 8, Рисунок 4). Определяли следующие аминокислоты (мМоль/мл): *незаменимые* – метионин, фенилаланин, треонин, лейцин, аргинин, лизин, гистидин, валин, изолейцин; *заменимые* – цистин, серин, аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая

кислота, пролин, аланин, тирозин, цитрулин и орнитин.

Таблица 8 – Аминокислотный состав питательных основ

№ п/п	Аминокислота	Содержание аминокислот в питательных основах, мМоль/мл	
		ПГ отходов производства мясной воды	ПГ сороги
Незаменимые аминокислоты:			
1	Метионин	3,32	3,45
2	Фенилаланин	5,86	24,73
3	Треонин	10,88	2,99
4	Лейцин	12,21	18,00
5	Аргинин	0,36	0
6	Лизин	5,57	13,50
7	Гистидин	25,71	2,50
8	Валин	8,25	8,72
9	Изолейцин	12,18	7,39
Заменимые аминокислоты:			
10	Цистин	0,18	0,68
11	Серин	8,93	2,14
12	Аспарагиновая кислота	17,07	4,67
13	Глицин	16,71	10,71
14	Глутаминовая кислота	42,42	20,45
15	Пролин	24,36	5,87
16	Аланин	16,73	13,44
17	Тирозин	13,90	1,09
18	Цитруллин	0	2,88
19	Орнитин	0	3,52

1

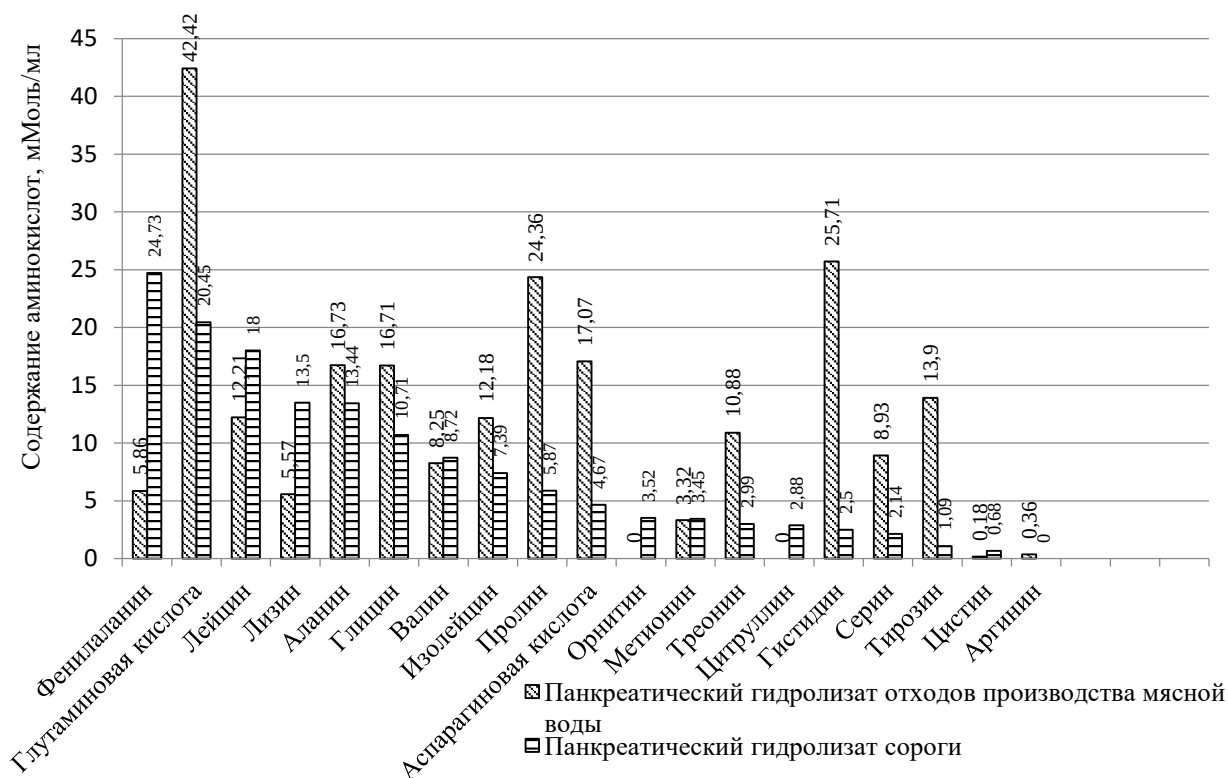


Рисунок 4 – Аминокислотный состав панкреатических гидролизатов отходов производства мясной воды и сороги

Для поддержания осмотического равновесия использовали натрия хлорид. Стабилизаторами кислотности (pH) среды служили натрия гидрокарбонат и натрия карбонат. Витамин В1 способствовал росту листерий, глюкозу применяли в качестве источника углерода [105].

Разработаны три версии питательных сред с различным составом и соотношением компонентов (Таблица 9).

Таблица 9 – Состав экспериментальных питательных сред с ПГ сороги и ГОПМВ

Состав питательной среды	Концентрация, г/л			
	Вариант I	Вариант II	Вариант III	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 В1)	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

Оценку специфической активности сконструированных питательных сред трех версий проводили по основным биологическим показателям – стабильность основных свойств штамма, чувствительность, скорость роста, эффективность среды, прорастание микроорганизма. Учет результатов испытаний исследуемых питательных сред с контрольной средой МПА с 1 % глюкозой проводили через 24-48 ч культивирования штамма *L. monocytogenes* 766. Результаты изучения специфической активности сконструированных питательных сред по биологическим показателям представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты изучения специфической активности сконструированных питательных сред по биологическим показателям

№ Питательной среды	Состав питательной среды, г/л	Скорость роста, ч	Культурально-морфологические свойства	Серологические свойства ОРА (1:100)	Биохимические свойства	Показатель прорастания микроорганизмов, % разведение 10 ⁻⁶	Чувствительность, КОЕ разведение 10 ⁻⁷	Контроль посевной дозы, КОЕ разведение 10 ⁻⁶	Эффективность, м.к./мл
Версия № 1	ГОПМВ – 21,0 NaCl – 3,5 Na ₂ CO ₃ – 0,68 Витамин В1 – 0,06 Глюкоза – 5,0 Агар – 9,0	24	типичные колонии S-форма Гр+ палочки	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)	–	7,3 ± 0,6 d = 1,0-1,5 мм	66,0 ± 2,6 d = 1,0-1,5 мм	3,4×10 ⁹
		48				114,5±2,0	7,6 ± 0,6 d = 2,0-2,5 мм	66,0 ± 2,6 d = 2,0 мм	
Версия № 2	ГОПМВ – 21,0 NaCl – 3,0 NaHCO ₃ – 0,68 Витамин В1 – 0,05 Глюкоза – 5,0 Агар – 9,0	24	«росинчатый» рост	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)	–	d < 1,0 мм	d < 1,0 мм	3,0×10 ⁹
		48	типичные колонии S-форма Гр+ палочки			103,6±1,7	6,3 ± 0,6 d = 2,0-2,5 мм	59,7 ± 2,0 d = 1,5-2,0 мм	
Версия № 3	ПГ сороги –11,0 ГОПМВ – 9,0 NaCl –3,0 Na ₂ CO ₃ – 0,65 Витамин В1– 0,05 Глюкоза– 5,0 Агар – 9,0	24	типичные колонии S-форма Гр+ палочки	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)	–	8,0 ± 1,0 d = 2,5-3,5 мм	74,0 ± 2,0 d = 1,5-2,5 мм	5,2×10 ⁹
		48				131,4±1,7	8,7 ± 0,6 d = 3,5-4,0 мм	75,7 ± 2,0 d = 3,0-3,5 мм	
МПА с 1% глюкозой	Пептон ферментативный – 10,0 Мясная вода – 1,0 л NaCl – 3,0 Глюкоза – 10,0 Агар – 11,0	24	«росинчатый» рост	4+	маннит (-) рамноза (+) ксилоза (-)	–	d < 1,0 мм	d < 1,0 мм	2,7×10 ⁹
		48	типичные колонии S-форма Гр+ палочки			–	5,3 ± 0,6 d = 1,0 мм	57,6 ± 1,5 d = 1,0 мм	

Примечания: Гр+ – грамположительные, «–» – подсчет колоний не проводили, d – диаметр колоний

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 ($p < 0,05$).

На вторые сутки на питательной среде версии № 3 диаметр колоний *L. monocytogenes* 766 достигал 4 мм, что в 4 раза больше, чем на контрольной среде ($p < 0,05$) (Рисунок 5). Полученные данные показывают преимущество данной серии перед средой МПА с 1 % глюкозой.

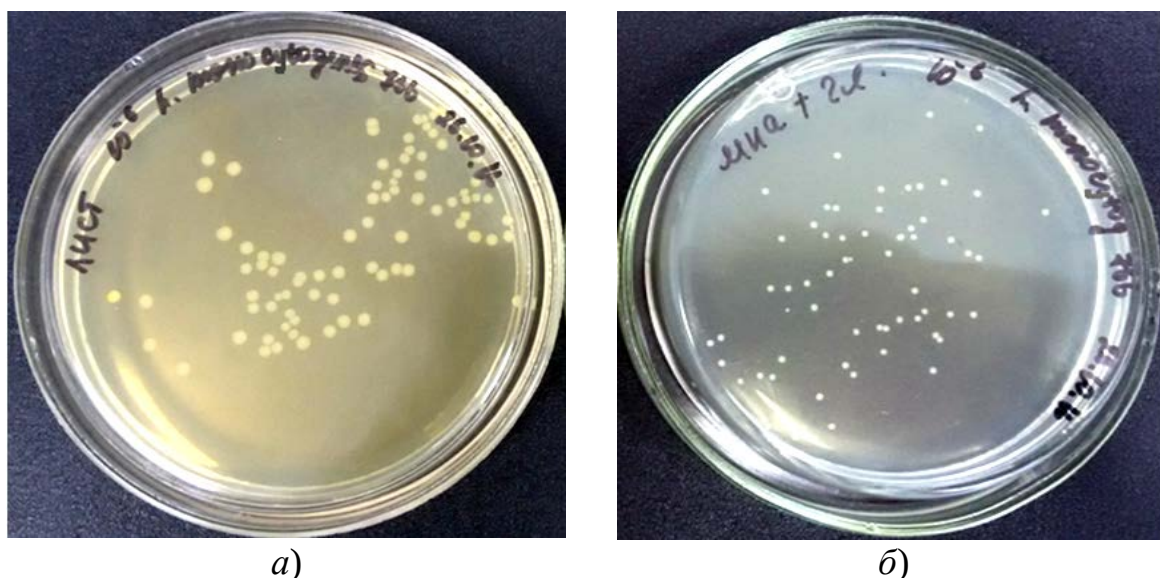


Рисунок 5 – Ростовые свойства питательной среды версии № 3 (а) и МПА с 1 % глюкозой (б) при культивировании тест-штамма *L. monocytogenes* 766

Определена эффективность питательных сред сконструированных на основе гидролизатов отходов производства мясной воды – версий № 1, 2 и ПГ сороги – версия № 3 (Рисунок 6).

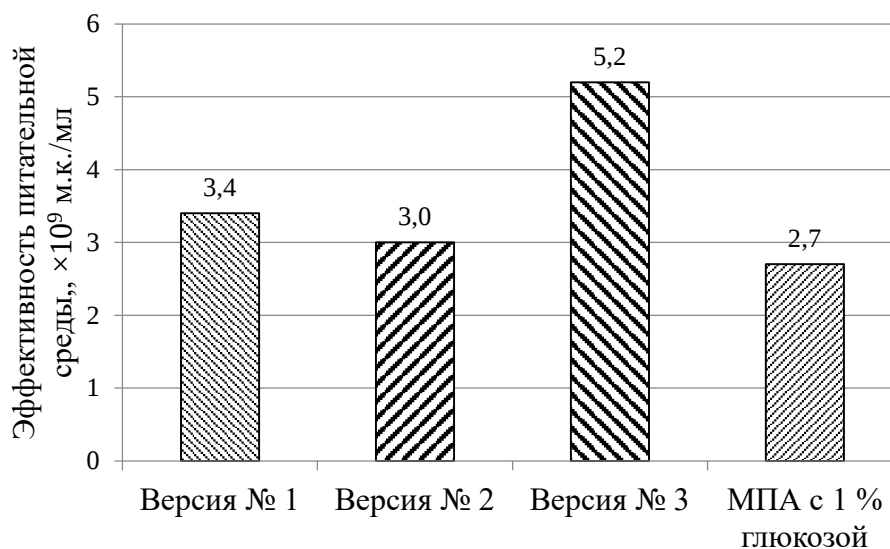


Рисунок 6 – Эффективность сконструированных питательных сред

По результатам исследования 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.

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).

3.4 Контроль качества питательной среды для культивирования листерий по физико-химическим и биологическим показателям

Физико-химические показатели качества питательной среды для культивирования листерий. Для изучения физико-химических свойств экспериментальной среды СКЛ (серия № 3) навеску 50 г растворяли в 1 л дистиллированной воды.

Определили физико-химические показатели среды СКЛ: препарат представляет собой однородный мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-коричневого цвета; pH – $7,4 \pm 0,02$; аминный азот – $4,83 \pm 0,07$ %; прочность студня среды – $531 \pm 13,66$ г; растворимость – 50 г препарата полностью расплавили в 1 л дистиллированной воды при помешивании и кипячении в течение 3 мин; прозрачность – раствор питательной среды имел легкую опалесценцию, по ОСО мутности не более 5 МЕ; потеря в массе при высушивании – $3,75 \pm 0,05$ %.

Биологические показатели качества питательной среды для культивирования листерий. По биологическим показателям среда СКЛ обеспечивала на всех засеянных чашках Петри типичный рост тест-штамма

L. monocytogenes 766 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-6} через 24 ч инкубации при температуре 37 ± 1 °С в виде белых с сероватым оттенком круглых, выпуклых с ровным краем, гладких колоний диаметром до $3,0 \pm 0,5$ мм.

3.5 Оценка способности тест-штамма *L. monocytogenes* 766 к сохранению биологических свойств на питательной среде для культивирования листерий

Поддержание в промышленных и лабораторных условиях штаммов микроорганизмов в первоначальном состоянии, с сохранением их биологических свойств (культурально-морфологических, серологических и т.д.) являются важным условием любой работы с культурами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов [107]. Кроме сохранения свойств штаммов необходимо обеспечить их выживаемость при длительном хранении. Общепринятым методом для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов является периодические пересевы культур на плотные питательные среды [14, 132].

Проведена оценка способности тест-штамма *L. monocytogenes* 766 по сохранению биологических свойств на СКЛ по восьми параметрам: 1) скорость роста; 2) показатели стабильности основных биологических свойств микроорганизма; 3) показателя прорастания; 4) чувствительности; 5) эффективности; 6) морфологии в мазках по Граму; 7) тест на каталазу; 8) культуральные признаки. В качестве контрольных сред использовали ГРМ-агар и МПА с 1 % глюкозой.

В результате проведенных опытов по сравнению способности тест-штамма *L. monocytogenes* 766 сохранять свои культурально-морфологические и серологические свойства длительное время на различных листериозных средах установлено, что скорость роста тест-штамма *L. monocytogenes* 766 после 3 мес хранения культуры на средах СКЛ, ГРМ-агаре и МПА с 1 % глюкозой с последующим высевом на соответствующие среды составила 18 ч

для СКЛ и ГРМ-агара, для МПА с 1 % глюкозой – 24 ч. После высева штамма *L. monocytogenes* 766 через 6 мес хранения скорость роста составила для СКЛ – 18 ч, для ГРМ-агара и МПА с 1% глюкозой – 24 ч. Через 9 мес хранения скорость роста *L. monocytogenes* 766 составила для всех исследуемых сред – 24 ч. После высева штамма со сред хранения через 12 мес скорость роста на средах СКЛ и ГРМ-агара составила 24 ч, на МПА с 1 % глюкозой рост отсутствовал (Таблица 11).

Таблица 11 – Результаты изучения биологических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766 в зависимости от сроков хранения на различных питательных средах при температуре 6 ± 2 °C, $M \pm m$

Наименование среды	Срок хранения, мес.	Скорость роста, ч	Показатель прорастания колоний, %	Чувствительность, КОЕ	Контроль посевной дозы, КОЕ	Культуральные признаки
			разведение 10^{-6} (100 м.к.)	разведение 10^{-7} (10 м.к.)	разведение 10^{-6} (100 м.к.)	
СКЛ	3	18	–	–	–	«росинчатый» рост
		24	123,7 $\pm$ 2,8	8,7 $\pm$ 0,6	88,6 $\pm$ 1,5	S-форма d = 1,0-1,5 мм
		48	125,7 $\pm$ 3,4	9,0 $\pm$ 0,6	90,0 $\pm$ 1,3	S-форма d = 3,0-4,0 мм
	6	18	–	–	–	«росинчатый» рост
		24	–	8,0 $\pm$ 0,6	78,0 $\pm$ 5,3	S-форма d = 1,0-1,5 мм
		48	120,9 $\pm$ 4,5	8,3 $\pm$ 1,1	79,0 $\pm$ 5,3	S-форма d = 3,0-4,0 мм
	9	18	–	–	–	Рост отсутствовал
		24	–	–	–	«росинчатый» рост d < 1,0 мм
		48	149,7 $\pm$ 4,8	7,0 $\pm$ 0,6	71,3 $\pm$ 7,5	S-форма d = 1,5-2,5 мм.
	12	18	–	–	–	Рост отсутствовал
		24	–	–	–	«росинчатый» рост
		48	–	6,6 $\pm$ 0,8	67,6 $\pm$ 2,4	S-форма d = 1,0-1,5 мм.
ГРМ-агар	3	18	–	–	–	«росинчатый» рост
		24	106,0 $\pm$ 5,0	5,6 $\pm$ 0,8	76,0 $\pm$ 4,6	S-форма d = 1,0-1,5 мм
		48	106,5 $\pm$ 4,9	6,0 $\pm$ 0,6	76,3 $\pm$ 4,4	S-форма d = 1,5-2,0 мм
	6	18	–	–	–	Рост отсутствовал
		24	–	–	–	«росинчатый» рост
		48	118,8 $\pm$ 2,9	5,6 $\pm$ 0,4	77,6 $\pm$ 2,2	S-форма d = 1,0-1,5 мм

Продолжение таблицы 11

	9	18	–	–	–	Рост отсутствовал
		24	–	–	–	«росинчатый» рост
		48	149,1±4,7	6,0±0,6	71,0 ± 7,3	Р-форма d = 1,5-2,0 мм
	12	24	–	–	–	«росинчатый» рост
		48	–	5,3±0,4	67,6±2,2	Р-форма d = 1,5-2,0 мм
МПА с 1% глюкозой	3	18	–	–	–	Рост отсутствовал
		24	–	–	–	«росинчатый» рост
		48	–	7,3±0,4	71,6±5,5	S-форма d = 1,0-1,5 мм
	6	18	–	–	–	Рост отсутствовал
		24	–	–	–	«росинчатый» рост
		48	–	6,3±0,4	65,3±3,7	S-форма d = 1,0-1,5 мм
	9	18	–	–	–	Рост не обнаружен
		24	–	–	–	«росинчатый» рост
		48	–	4,0±0,6	47,6±2,2	S-форма d = 1,0-1,5 мм
	12	18	–	–	–	Рост отсутствовал
		24	–	–	–	Рост отсутствовал
		48	–	–	–	Рост отсутствовал

Примечание: d – диаметр колоний, мм; при d < 1 – количество колоний не подсчитывалось, «–» – нет данных

При изучении стабильности основных биологических свойств микроорганизма установлено, что через 3 и 6 мес хранения со всех сред, взятых в опыт, колонии тест-штамма вырастали в стабильной S-форме. Через 9 мес S-форму сохраняли листерии только на средах СКЛ и МПА с 1 % глюкозой. При просмотре мазков, окрашенных по Граму, отмечали типичные для листерий короткие грамположительные палочки. На среде ГРМ-агар наблюдалась диссоциация в R-форму колоний исследуемого штамма.

По показателю прорастания микробных клеток определили, что данные по среде СКЛ в среднем в 1,1 раза выше, чем на среде ГРМ-агар (в качестве контрольной среды использовали МПА с 1 % глюкозой). По результатам исследования через 9 мес хранения среда МПА с 1 % глюкозой не обеспечивала рост штамма *L. monocytogenes* 766. Поэтому, исходя из данных таблицы 10, показатель прорастания среды для СКЛ составил 149,7±4,8 %. Результаты,

полученные через 9 мес хранения штамма на среде ГРМ-агар ($149,1 \pm 4,7$ %) не учитывались в связи с диссоциацией штамма.

При определении чувствительности питательной среды установлено, что испытываемые среды обеспечивали рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766 при высеве из разведения 10^{-7} . На чашках со средой СКЛ из разведения 10^{-7} во все сроки наблюдения, выросло в среднем на вторые сутки $8,0 \pm 0,7$ КОЕ, что превышало значение чувствительности контрольных сред ГРМ-агара и МПА с 1 % глюкозой в 1,4 и 1,8 раза, соответственно. Через 48 ч культивирования диаметр колоний *L. monocytogenes* 766 на среде СКЛ (3 и 6 мес хранения) достигал 4 мм, что в 4 раза больше, чем на контрольных средах.

Культура листериозного микроба, выращенная на плотных питательных средах, после пересева со сред хранения отличалась по культурально-морфологическим свойствам. На среде СКЛ через 3, 6, 9 и 12 мес хранения наблюдался типичный рост высеяного тест-штамма *L. monocytogenes* 766. На ГРМ-агаре через 3-6 мес хранения отмечался типичный рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766, а через 9-12 мес хранения штамм диссоциировал в R-форму – колонии плоские с неровным краем, поверхность шероховатая, матовая, структура крупнозернистая. На МПА с 1 % глюкозой колонии тест-штамма *L. monocytogenes* 766 плоские с ровным краем, через 12 мес рост отсутствовал.

Эффективность питательной среды определяли согласно МУК 4.2.2316-08 [80]. Рассчитан выход микробных клеток с 1 мл питательной среды (в млрд./мл) и прирост числа микроорганизмов относительно засеянного. Для питательных сред СКЛ, ГРМ-агара и МПА с 1 % глюкозой определена эффективность через 3, 6 и 9 мес хранения (Рисунок 7).

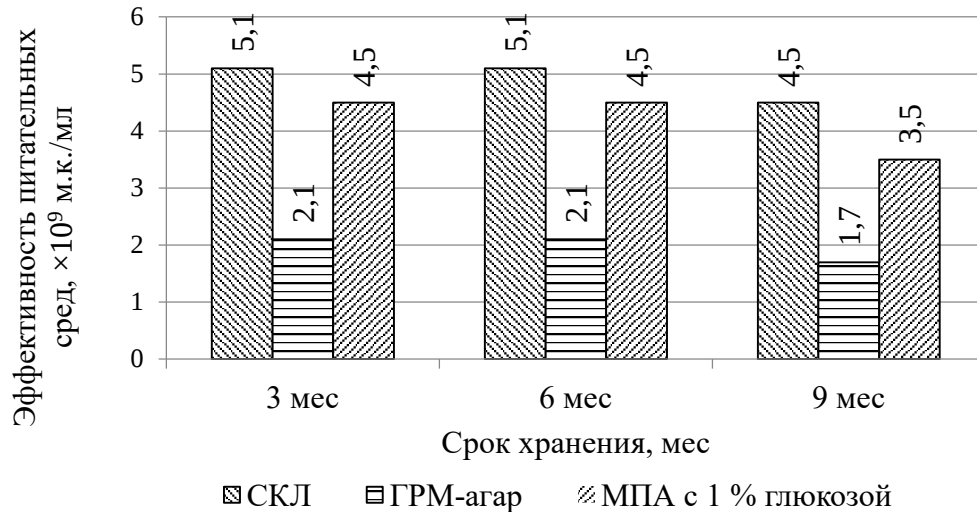


Рисунок 7 – Определение эффективности питательных сред СКЛ, ГРМ-агара и МПА с 1 % глюкозой через 3, 6 и 9 мес хранения

По результатам исследования, эффективность испытуемых сред составила: через 3 и 6 мес хранения СКЛ – $5,1 \times 10^9$ м.к./мл; ГРМ-агара $2,1 \times 10^9$ м.к./мл и МПА с 1 % глюкозой – $4,5 \times 10^9$ м.к./мл. Через 9 мес эффективность испытуемых сред незначительно снизилась и составила для СКЛ – $4,5 \times 10^9$ м.к./мл, для ГРМ-агара – $1,7 \times 10^9$ млрд. м.к./мл среды и МПА с 1 % глюкозой – $3,5 \times 10^9$ м.к./мл (расчет производили по п.7.7 МУК 4.2.2316-08). Темпы снижения показателей эффективности с 6 мес по 9 мес хранения составили для СКЛ – 11,8 %, для ГРМ-агара – 19,1 % и МПА с 1 % глюкозой – 22,2 %.

Таким образом, тест-штамм *L. monocytogenes* 766 сохранял культуральные свойства в течение 12 мес в S-форме только на среде СКЛ. Эффективность среды СКЛ выше по сравнению с ГРМ-агаром и МПА с 1 % глюкозой в среднем 2,5 и 1,2 раза, соответственно ($p < 0,05$) и составляла $4,9 \times 10^9$ м.к./мл питательной среды. На среде ГРМ-агар после хранения листерий в течение 9 мес произошла диссоциация штамма в R-форму.

В течение всего срока наблюдения штамм *L. monocytogenes* 766 сохранял свои типичные биохимические свойства по способности ферментировать маннозу, мальтозу, глюкозу и отсутствию способности ферментировать кси-

лозу, маннит и дульцит (Таблица 12). Так же в течение всего срока определялся положительный каталазный тест.

Таблица 12 – Результаты исследования биохимических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766 при хранении в течение 12 мес и температуре 6 ± 2 °С

Название среды	Срок хранения, мес.	Манноза	Мальтоза	Глюкоза	Ксилоза	Маннит	Дульцит
СКЛ	3	+	+	+	–	–	–
	6	+	+	+	–	–	–
	9	+	+	+	–	–	–
	12	+	+	+	–	–	–
ГРМ-агар	3	+	+	+	–	–	–
	6	+	+	+	–	–	–
	9	+	+	+	–	–	–
	12	+	+	+	–	–	–
МПА с 1 % глюкозой	3	+	+	+	–	–	–
	6	+	+	+	–	–	–
	9	+	+	+	–	–	–
	12	Нет роста					

Примечание: «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат

Оценка биологических показателей (скорость роста, стабильность основных биологических свойств микроорганизма, показатели прорастания, чувствительности, эффективности, морфология в мазках, окрашенных по Граму, тест на каталазу и культуральные признаки) тест-штамма *L. monocytogenes* 766 после хранения на различных питательных средах свидетельствует, что сконструированная питательная среда для культивирования листерий имеет значительное преимущество в сравнении с МПА с 1 % глюкозой, ГРМ-агаром и пригодна для длительного хранения тест-штамма *L. monocytogenes* 766. Культура *L. monocytogenes* 766, выращенная на питательной среде СКЛ обладала всеми типичными для листерий свойствами, не диссоциировала, показала положительный результат в ОРА (1:100) на 4 креста с сывороткой листериозной. Далее штамм *L. monocytogenes* 766, выращенный на экспериментальной питательной среде СКЛ использовали в последующих этапах работы в качестве антигена для иммунизации животных-продуцентов при производстве сыворотки листериозной.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СЫВОРОТКИ ЛИСТЕРИОЗНОЙ АГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ

Для подбора схемы иммунизации нами апробированы методики получения агглютинирующих сывороток, разработанные в лаборатории диагностических сывороток нашего института. Для получения сыворотки листериозной агглютинирующей подобрали концентрацию антигена, способ его введения, кратность, величину доз и их нарастание, перерывы между инъекциями, общую продолжительность курса иммунизации. Провели серию экспериментов по подработке оптимальной технологии получения сыворотки листериозной агглютинирующей. В сравнительных опытах исследовали агглютиногенность корпускулярного антигена инактивированного кипячением при 100 °С в течение 1 ч.

Проведен анализ литературных данных и результатов производственного опыта по получению диагностических сывороток. В качестве лабораторного животного выбрали кроликов породы шиншилла. Кролики широко используются в качестве лабораторной модели, т.к. обладают высокой иммунологической реактивностью. Диагностические сыворотки, полученные от кроликов-продуцентов не содержат неспецифические антитела, что исключает этап адсорбции гетерологичных антител [78].

Перед иммунизацией сыворотку крови используемых в опыте кроликов исследовали в РРА на содержание антител к возбудителю листериоза. Листерийные антитела не выявлены.

4.1 Подбор схемы иммунизации кроликов-продуцентов

В качестве иммуногена использовали корпускулярный антиген, полученный из биомассы 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 – $0,080 \pm 0,001$.

Результаты проверки специфической стерильности листериозного иммуногена в течение 6 сут показали отсутствие роста культуры *L. monocytogenes* 766.

Для получения сыворотки листериозной проводили иммунизацию кроликов по двум схемам: с применением полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) (Sigma-Aldrich, США) и без ПАФ (Таблица 13).

Таблица 13 – Схемы иммунизации кроликов-продуцентов

Первая схема иммунизации кроликов					
Время, дни	Способ введения	Доза ПАФ, мл	Доза иммуногена, мл	Доза сыворотки, мл	Титр анти-тел в РРА
I цикл иммунизации					
1	В обе подушечки задних лап	0,6	—	—	—
8	Каждый задний под-коленный лимфати-ческий 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 по 0,6 мл ПАФ в подушечки задних лап, далее на 8 день – смесь иммуногена 0,2 мл (1 млрд. м.к.) с 0,5 мл ПАФ в каждый задний подколенный лимфатический узел и такую же дозу внутримышечно без ПАФ. Затем на 15 день проводили вторую инъекцию смесью иммуногена 0,2 мл (2,4 млрд. м.к.) с 0,5 мл ПАФ в обе подушечки передних лап и такую же дозу внутримышечно без ПАФ. На 22 день проводили забор крови и определяли титр антител в сыворотке. В последующем, на 37 день проводили II цикл иммунизации, который предусматривал трехкратное внутривенное введение комплекса антиген-антитело (АГ-АТ). Для получения комплекса АГ-АТ (не менее 3 мл сыворотки) 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, с интервалом между инъекциями 5 дней. Одновременно каждому животному внутримышечно вводили смесь иммуногена в вышеуказанных дозах с 0,5 мл ПАФ. На 54 день в сыворотке крови кроликов определяли титры антител в РРА. 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). После получения результатов, проводили процедуру кровопускания у кроликов.

Динамика накопления антител в сыворотке крови кроликов показана на рисунке 8.

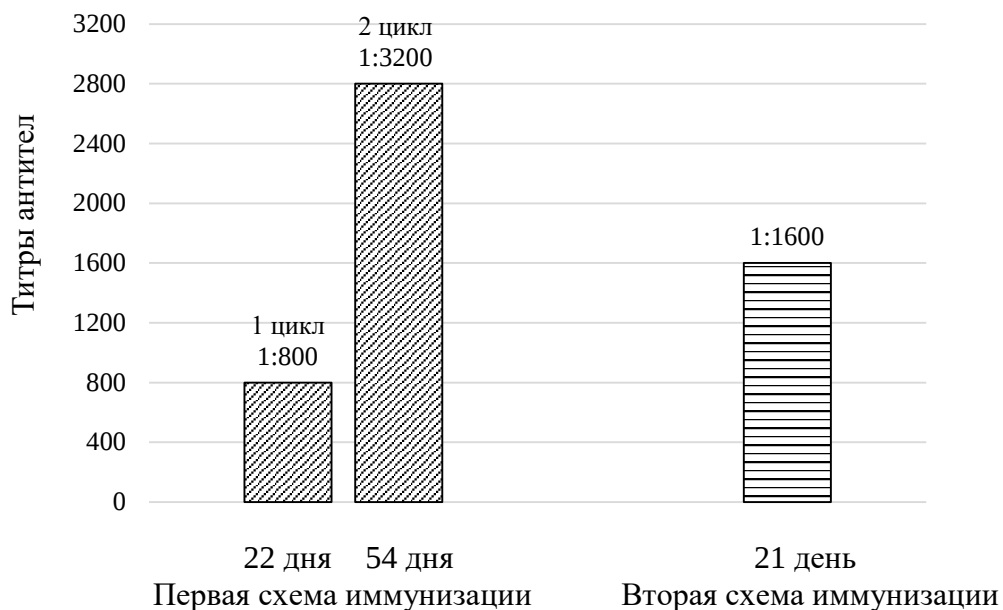


Рисунок 8 – Изменение титра антител в развернутой реакции агглютинации в сыворотке крови кроликов, иммунизированных с применением ПАФ и без ПАФ

По первой схеме по завершении I цикла иммунизации на 22 день получены титры антител в РРА 1:800, далее по окончании II цикла на 54 день титры антител составили 1:3200. По второй схеме иммунизации к 21 дню титры антител достигли уровня 1:1600. Чувствительность в сыворотках листериозных, полученных по двум схемам иммунизации кроликов-продуцентов отличались, титры антител по первой схеме в 1,8 раза выше, чем по второй.

Несмотря на достаточно высокие титры антител (1:3200) в сыворотках листериозных, полученных по первой схеме иммунизации, нами выбрана вторая схема. Это связано с тем, что первая схема иммунизации сложнее, более длительна, трудоёмка и состоит из двух циклов, общей протяженностью в 55 дней. Также необходимо приготовление смеси иммуногена с ПАФ для усиления иммунного ответа, который животным неоднократно вводится внутривенно и внутримышечно в несколько мест (подушечки задних и передних лап, задние подколенные лимфатические узлы).

Таким образом, подобрана оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов без применения ПАФ с использованием трехкратного введения листериозного иммуногена, которая обеспечивает получение сыворотки листериозной с титром антител 1:1600. В серологических исследованиях А. И. Смирнова (1958) на листериоз приняты диагностические титры антител – 1:400, так как при этих разведениях наблюдали совпадения показаний в РА и РСК [8].

При изучении специфичности сыворотки листериозной, полученных по обеим схемам иммунизации, в РРА и ОРА получен отрицательный результат с близкородственными и гетерологичными штаммами: *L. innocua* ба 304004, *L. ivanovii* 97к-88, *E. coli* ATCC 25922, *Sh. flexneri* 170, *S. Typhimurium* 21, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. aureus* 6538. На основании вышеуказанных данных установлено, что сыворотки листериозные, полученные по обеим схемам иммунизации кроликов-продуцентов обладали высокой специфичностью и не нуждались в адсорбции гетерологичных антител.

В дальнейшем технологическом процессе производства сыворотки листериозной применяли вторую схему иммунизации кроликов-продуцентов, период которой составлял 21-22 дня.

4.2 Изучение и оценка стабильности сыворотки листериозной агглютинирующей

Стабильность физических свойств и чувствительность является основным показателем качества выпускаемых сывороток. При оценке стабильности препаратов определен допустимый уровень снижения их специфической активности (чувствительности). В лабораторной диагностике при идентификации микроорганизма агглютинирующей сывороткой, если значения РА показывают титр или половину значения титра, то данную культуру можно отнести к этому виду. Следовательно, сыворотки листериозные в течение срока годности не должны терять более 50 % своей активности.

Денатурация и гидролиз белков в диагностических сыворотках под

действием протеолитических ферментов, является причиной изменения активности и физических свойств сывороточных препаратов. Интерес представляют способы сохранения качества диагностических препаратов в процессе хранения. В связи с этим, представлялось интересным изучить действие на белковый компонент сывороточных препаратов некоторых стабилизирующих веществ, которые могли бы предотвратить денатурацию белков и инактивировать протеолитические ферменты для сохранения функциональной активности антител сыворотки листериозной.

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, 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. При этом сыворотки серий – 41 (дата выпуска 15.04.2015 г.), 42 (дата выпуска 17.04.2015 г.) и 43 (дата выпуска 05.10.2016 г.) закладывали на хранение при температуре 60 °С в течение 50 сут в лабораторный инкубатор FRIOCELL 222. По истечении каждых пяти суток, отбирали по три ампулы с сывороткой листериозной и хранили вместе с контрольными образцами при температуре 6±2 °С. По окончании исследования во всех пробах и контрольных образцах сывороток определяли титры антител в РРА с использованием тест-штамма *L. monocytogenes* 766, кислотность (рН), остаточную влажность и растворимость (Таблица 14). Так же фиксировали время снижения титров антител на 50 % посуточно.

Таблица 14 – Влияние стабилизаторов на стабильность сыворотки листериозной, $M \pm m$

Серия сыворотки	Стабилизатор	pH	Остаточная влажность, %	Растворимость, мин	Обратные титры АТ	Срок снижения титров АТ, сут ^{xx}
41	Сорбит 2,5 %	5,7±0,04	2,4±0,04	7±1,3	1241±213	15
	Сахароза 3 %	7,7±0,13	1,8±0,11	6±1,1	1712±500	45
	Тиосульфат натрия 1 %	7,7±0,11	1,9±0,04	4±0,4	1500±175	40
	Сахароза 3 % + тиосульфат натрия 1 %	7,7±0,15	1,9±0,13	1±0,4	1610±77	50
	Поливинил-пирролидон 1 %	7,7±0,17	2,0±0,15	7±1,1	1011±59	30
Контроль ^x серия 41		7,72±0,13	1,9±0,15	8±0,88	1740±123	10
42	Сорбит 2,5 %	6,28±0,11	2,0±0,2	7±0,4	1941±633	15
	Сахароза 3 %	6,7±0,11	1,7±0,22	7±1,3	1012±21	30
	Тиосульфат натрия 1 %	7,65±0,17	1,9±0,22	5±0,3	1455±139	30
	Сахароза 3 % + тиосульфат натрия 1 %	7,66±0,17	1,7±0,17	1±0,4	1444±725	45
	Поливинил-пирролидон 1 %	7,65±0,11	1,8±0,2	8±0,4	1111±582	30
Контроль ^x серия 42		7,66±0,11	1,7±0,2	10±0,4	1573±523	5
43	Сорбит 2,5 %	5,58±0,04	1,9±0,17	8±0,6	1458±722	15
	Сахароза 3 %	7,7±0,11	1,6±0,17	5±0,6	1247 ± 821	40
	Тиосульфат натрия 1 %	7,68±0,15	1,7±0,08	4±0,8	1324±145	40
	Сахароза 3 % + тиосульфат натрия 1 %	7,69±0,15	1,7±0,15	1±0,4	1699±252	45
	Поливинил-пирролидон 1 %	7,65±0,08	1,7±0,2	7±0,6	1444±511	30
Контроль ^x серия 43		7,69±0,06	1,7±0,24	7±1,3	1652±177	10

Примечание: ^x – лиофилизированная сыворотка без стабилизатора, ^{xx} – срок снижения титра АТ до уровня 50 % в процессе хранения при 60 °С в сутках

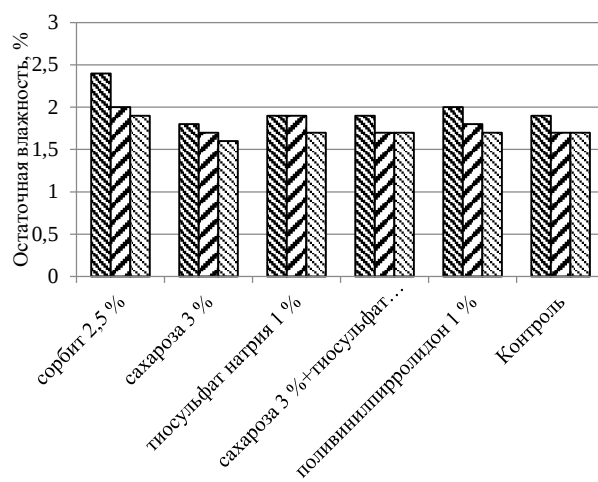
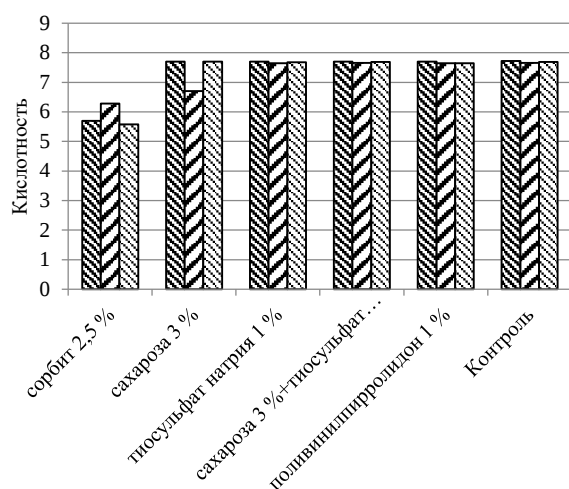
Влияние стабилизаторов на кислотность (pH) сывороток листериозных. Согласно требованиям производственного регламента показатель кис-

лотности (рН) МИ составлял 7,5-8,5. В ходе экспериментальных работ установлено, что применение сорбита 2,5 % 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 % сахара, 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) (Рисунок 9а).

Определение потери в массе при высушивании сыворотки листериозной. Остаточная влажность препарата оказывает влияние на специфическую активность и растворимость, в производственном регламенте показатель потери в массе при высушивании должен быть не более 2,5 %. Средний показатель остаточной влажности трех серий сывороток со стабилизатором 2,5 % сорбитом составил 2,1 %, 1 % тиосульфатом натрия, 3 % сахара + 1 % тиосульфат натрия и 1 % поливинилпирролидоном – по 1,8 %, 3 % сахарозой – 1,7 %. В контрольных сериях сывороток листериозных без стабилизаторов остаточная влажность не превышала 1,9 %. По результатам исследования установлено, что все исследуемые серии сывороток и контрольные образцы соответствовали нормируемому показателю остаточной влажности (Рисунок 9б).

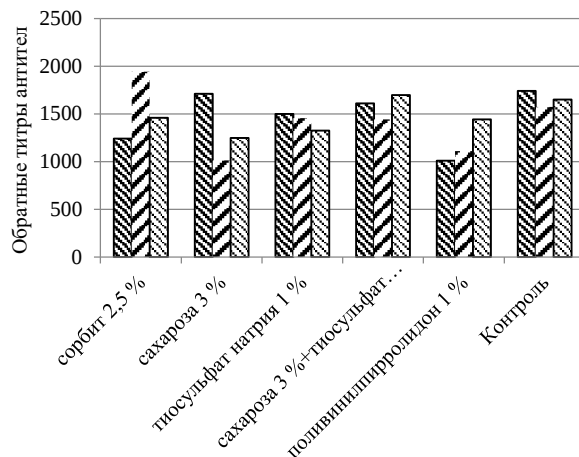
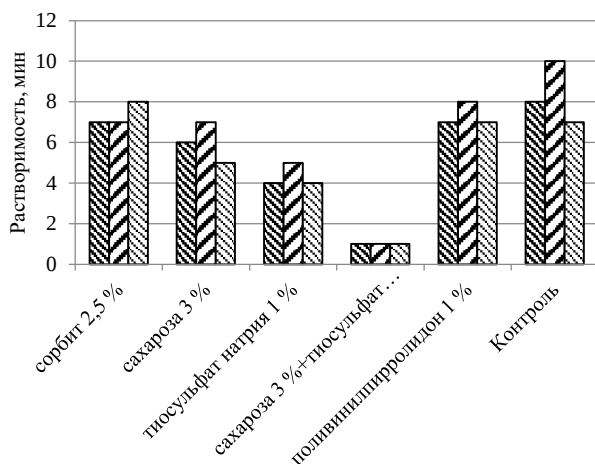
Показания растворимости сыворотки листериозной. Нормируемый показатель растворимости сыворотки составляет не более 10 мин в 1 мл стерильной дистиллированной воды. Растворение сыворотки листериозной с 2,5 % сорбитом и 1 % поливинилпирролидоном в среднем составило по 7,2 мин, 3 % сахарозой – 6,0 мин, 1 % тиосульфатом натрия – 4,2 мин и в комбинации 3 % сахарозы с 1 % тиосульфатом натрия – 1 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 влажности (Рисунок 9в).

Определение срока двукратного снижения титров АТ в исследуемых сыворотках. В контрольных образцах снижение титра АТ на 50 % произошло на 8 сут хранения при температуре 60 °С (Рисунок 9г). 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.



9a – Кислотность

9б – Остаточная влажность



9в – Растворимость

9г – Обратные титры антител

▨ 41 серия ▧ 42 серия ▩ 43 серия

Рисунок 9 – Изучение стабильности сыворотки листериозной агглютинирующей (серии 41, 42 и 43)

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 [78].

Дальнейшие испытания проводили по подбору оптимальных концентраций сахарозы и тиосульфата натрия для стабилизации сыворотки листериозной.

Таблица 15 – Влияние сахарозы и тиосульфата натрия в различных концентрациях на стабильность сыворотки листериозной агглютинирующей, $M \pm m$

Серия сыворотки	Содержание стабилизаторов в сыворотке, %		Обратные титры АТ	рН	Остаточная влажность, %	Растворимость, мин	Срок снижения титров АТ, сут ^{xx}
	сахароза	тиосульфат натрия					
41	Контроль (свежеприготовленная сыворотка)		1740±123	7,7±0,20	1,9±0,29	8,0±1,16	10
	1,0	0,30	1800±99	7,5±0,10	1,9±0,31	2,5±0,50	5
	1,1	0,36	1850±241	7,9±0,11	2,0±0,12	0,5±0,15	10
	2,2	0,75	1700±504	8,2±0,12	2,1±0,21	1,5±0,20	45
	3,0	1,00	1700±47	7,7±0,06	2,0±0,43	1,0±0,40	50
	4,5	1,50	1856±12	7,7±0,15	4,3±0,21	1,0±0,18	45
	5,4	1,80	1593±542	7,3±0,21	5,2±0,2	1,0±0,31	25
42	Контроль (свежеприготовленная сыворотка)		1573±523	7,7±0,23	1,7±0,11	10±1,00	5
	1,0	0,30	1600±241	7,5±0,10	1,7±0,20	2,5±0,15	5
	1,1	0,36	1599±45	7,9±0,06	1,8±0,44	1,0±0,17	10
	2,2	0,75	1625±25	8,1±0,10	1,9±0,27	1,5±0,21	40
	3,0	1,00	1561±127	7,7±0,10	1,8±0,38	1,0±0,25	45
	4,5	1,50	1598±41	7,6±0,11	4,0±0,20	1,0±0,21	40
	5,4	1,80	1652±52	7,2±0,17	4,9±0,20	1,0±0,25	25

Примечание: ^x – лиофилизированная сыворотка без стабилизатора, ^{xx} – срок снижения титра АТ до уровня 50 % в процессе хранения при 60 °С в сутках

Нами 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 (Таблица 15).

Из результатов исследования следует, что наибольшим стабилизирующим эффектом на испытуемую сыворотку оказывали стабилизаторы в комбинации сахарозы и тиосульфата натрия при внесении их в долевом соотношении, (%): 2,2:0,75; 3,0:1,0 и 4,5:1,5, соответственно. Однако при содержании в сыворотке 4,5 % сахарозы и 1,5 % тиосульфата натрия значительно повышается остаточная влажность препарата, что не повлияло на стабильность, она оставалась на прежнем уровне. При дальнейшем увеличении концентрации стабилизаторов остаточная влажность возрастала, а стабильность снижалась.

Полученные данные свидетельствовали о возможности применения в качестве стабилизатора сыворотки листериозной смеси сахарозы и тиосульфата натрия. Концентрация сахарозы может варьировать от 2,2 до 3 %, тиосульфата натрия – от 0,75 до 1 %. В дальнейшем в производстве сыворотки листериозной выбраны стабилизаторы и их концентрации – 3 % сахароза и 1 % тиосульфат натрия.

4.3 Этап стабилизации сыворотки листериозной агглютинирующей

Процесс изготовления кроличьей сыворотки листериозной состоит из нескольких этапов, основными из которых являются: иммунизация, кровопускание, получение сыворотки, консервация, стабилизация, стерилизующая фильтрация, контроль микробиологической чистоты, определение чувствительности и специфичности, розлив и лиофильная сушка. Внесение стабилизатора возможно на некоторых этапах, начиная с получения сыворотки из крови животного-продуцента. Однако нужно учесть, что добавление его на первых этапах может повлиять на процесс в последующих операциях, при этом не оказав в то же время серьезного влияния на стабильность препарата.

Поэтому необходимо подобрать оптимальный способ внесения стабилизатора в сыворотку листериозную.

В производстве МИ стабилизаторы вносят до этапа лиофилизации, это является одним из важных моментов, влияющих на качество препарата, в том числе и на его стабильность. Добавление стабилизатора перед розливом сыворотки листериозной в ампулы, требует ее дополнительной стерилизации. Для исключения повторной фильтрации, мы предлагаем вносить стабилизаторы из расчета: 30 г/л сахарозы и 10 г/л тиосульфата натрия, после этапа внесения консерванта, перед стерилизующей фильтрацией сыворотки листериозной. Далее сыворотку листериозную фильтровали через капсульный фильтр Sartobran (Sartorius, Германия) под давлением 55 ± 5 кПа. Перед розливом в ампулы, сыворотку листериозную контролировали на стерильность, чувствительность и специфичность. Такой способ внесения стабилизаторов позволил получать стабильный и стерильный препарат.

4.4 Изучение стабильности сыворотки листериозной для установления срока годности

Для обоснования срока годности сыворотки листериозной необходимы данные по ее стабильности. Определение стабильности предполагает изучение влияния на качество МИ таких факторов, как температура, влажность и др. Для этого через определенные интервалы времени определяли титры антител сыворотки листериозной в пределах срока годности препарата, на основании чего устанавливали условия хранения и срок годности. Испытания проводили на трех сериях сывороток, хранившихся в рекомендуемых и неблагоприятных условиях, определяли титры антител и физико-химические свойства.

Долгосрочные испытания стабильности

За период с 2015 по 2021 гг. нами отобраны образцы сывороток листериозных (серий 41, 42 и 43) для изучения ее стабильности с целью установ-

ления срока годности (Таблица 16). У всех образцов определяли титры антител в РРА и ОРА. Учет результатов проводили по четырёхкрестовой системе.

Таблица 16 – Исследование долгосрочных испытаний стабильности сыворотки листериозной агглютинирующей

Серия сыворотки	Дата выпуска	Год выемки образца	Срок хранения, мес.	Титры антител в РРА			Титры антител в ОРА 1:100
				1:100	1:200	1:400	
41	04.2015 г.	2015	1	4+	4+	4+	4+
		2016	12	4+	4+	4+	4+
		2017	24	4+	4+	4+	4+
		2018	36	4+	4+	4+	4+
		2019	48	4+	4+	4+	4+
		2020	60	4+	4+	4+	4+
42	04.2015 г.	2015	1	4+	4+	4+	4+
		2016	12	4+	4+	4+	4+
		2017	24	4+	4+	4+	4+
		2018	36	4+	4+	4+	4+
		2019	48	4+	4+	4+	4+
		2020	60	4+	4+	4+	4+
43	10.2016 г.	2016	1	4+	4+	4+	4+
		2017	12	4+	4+	4+	4+
		2018	24	4+	4+	4+	4+
		2019	36	4+	4+	4+	4+
		2020	48	4+	4+	4+	4+
		2021	60	4+	4+	4+	4+

Согласно результатам исследования, испытуемые серии сывороток листериозных сохраняли свою чувствительность в титрах антител в ОРА – 1:100 и РРА – 1:400, в течение всего срока наблюдения. Кроме того, по показателям качества (внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность, рН, специфичность) сыворотка листериозная соответствовала требованиям ТУ 21.20.23-015-01898090-2018. Таким образом, срок годности сыворотки листериозной агглютинирующей составил 5 лет при температуре хранения 6 ± 2 °С.

Испытания стабильности методом «ускоренного старения»

Для установления сроков хранения МИ в настоящее время используются методы ускоренных испытаний с последующим прогнозированием изменения свойств в условиях хранения. Для определения стабильности сыворотки листериозной применяли методику «ускоренного старения» антител

использованием множественного изотермического метода Р. Jameson [179]. Для расчета срока годности и оптимальных сроков хранения сыворотки использовали онлайн-сервис «МНК и регрессионный анализ Онлайн + графики» – программа, с помощью которой построены экспоненциальные кривые, выведены уравнения экспоненциальной регрессии (методом наименьших квадратов) и рассчитаны коэффициенты корреляции.

Ускоренные испытания стабильности сыворотки листериозной проводили при различных температурных параметрах и времени хранения. Сыворотку серии 46 (дата выпуска 11.2019 г.) выдерживали в лабораторном инкубаторе при четырех температурных режимах 60, 70, 80 и 90 °С в течение 50 сут. В зависимости от режима и срока хранения отбирали по 2 ампулы сыворотки листериозной на 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 и 50 сут, и помещали их при температуре 6 ± 2 °С до окончания опыта. Контролем опыта служила сыворотка листериозная этой же серии, хранившаяся постоянно при температуре 6 ± 2 °С. По окончании исследования одновременно во всех сыворотках проверяли физико-химические показатели (внешний вид, цветность, растворимость, прозрачность, pH), чувствительность и специфичность. Показатели титров антител в РРА сыворотки листериозной в тесте на «ускоренное старение» представлены в таблице 17.

Исходя из полученных данных, в тесте на «ускоренное старение» антител сыворотки листериозной при температуре 60 °С на 50-ые сут показан отрицательный результат в РРА во всех разведениях. При температуре 70 °С хранения наблюдается снижение титров антител на 30 сут. При воздействии высоких температур 80 и 90 °С стабильность сыворотки листериозной сохранялась до 20 и 3 сут, соответственно. По физико-химическим показателям и специфичности исследованная сыворотка листериозная серия 46 в течение всего срока испытаний методом «ускоренного старения» соответствовала требованиям ТУ 21.20.23-015-01898090-2018.

Таблица 17 – Показатели титров антител сыворотки листериозной в тесте на «ускоренное старение»

Серия сыворотки	Температура хранения, °С	Срок хранения, сут.	Титры антител в РРА		
			1:100	1:200	1:400
46	6	контроль	4+	4+	4+
	60	20	4+	4+	4+
		30	4+	4+	3-4+
		40	3+	3+	3+
		50	+	+	+
	70	10	4+	4+	4+
		20	4+	4+	3+
		30	2+	3+	2+
		50	–	–	–
	80	5	4+	4+	4+
		10	4+	4+	2-3+
		20	3+	3+	2+
		30	3+	2+	+
	90	1	4+	4+	3-4+
		3	4+	4+	3+
		5	2+	3+	2+
		10	–	–	–

Примечание: «–» – отрицательная РРА

Построены экспоненциальные кривые зависимости титров антител в РРА от сроков хранения при заданных температурах с использованием программы «МНК и регрессионный анализ Онлайн + графики». На основе полученных уравнений регрессии рассчитали время снижения титров антител на 50 % при заданных температурах хранения сыворотки листериозной (Таблица 18).

Таблица 18 – Зависимость титров антител (%) сыворотки в тесте на «ускоренное старение» и времени хранения при разных температурах

Температура, °C	Графики зависимостей титров антител (%) сыворотки листериозной и времени хранения (сут) при различных температурах	Уравнения экспоненциальной регрессии
60		$y = e^{4,1004-0,0087x}$, (1) y – время хранения сыворотки, сут; e – основание натурального логарифма, равен 2,71828; x – титры антител, %; R – коэффициент корреляции, равный 0,86; Из уравнения (1) следует, что при хранении сыворотки листериозной при температуре 60 °C через 39,0 сут титры антител снижаются на 50 %.
70		$y = e^{3,8141-0,0137x}$, (2) $R = 0,94$ При хранении сыворотки листериозной при температуре 70 °C через 22,8 сут титры антител снижаются на 50 %.
80		$y = e^{3,7684-0,0212x}$, (3) $R = 0,94$ При хранении сыворотки листериозной при температуре 80 °C через 15,0 сут титры антител снижаются на 50 %.
90		$y = e^{2,4971-0,0233x}$, (4) $R = 0,93$ При хранении сыворотки листериозной при температуре 90 °C через 3,7 сут титры антител снижаются на 50 %.

Примечание: x – титры антител (в %) сыворотки листериозной в РРА; y – время хранения (сут)

Рассчитано время снижения титров антител на 50 % в испытуемой сыворотке на 39,0; 22,8; 15,0 и 3,7 сут при температурах хранения 60, 70, 80 и 90 °С, соответственно.

По полученным результатам с применением метода «ускоренного старения» построили график зависимости температур (60, 70, 80 и 90 °С) и рассчитанного времени хранения (39,0; 22,8; 15,0 и 3,7 сут) при снижении титров антител на 50 % в сыворотке листериозной серии 46 (Рисунок 10).

Время хранения, сут

Температура, °С

Рисунок 10 – Экспоненциальная кривая зависимости титров антител в испытуемой сыворотке листериозной от температур и времени хранения

Далее на основе полученных данных в программе «МНК и регрессионный анализ Онлайн + графики» получили уравнение регрессии для прогнозирования срока годности сыворотки при рекомендуемом температурном режиме хранения:

$$y = e^{8,315-0,0748x}, \text{ где } (5)$$

y – время хранения сыворотки, сут;

e – основание натурального логарифма, равен 2,71828;

x – температура хранения сыворотки, °С;

R = 0,94.

Из уравнения (5) следует, что методом экстраполяции можно рассчитать время хранения сыворотки в сутках при температуре 6 ± 2 °С:

$$y = e^{8,315 - 0,0748 \times 6} = 2607 \pm 320 \text{ сут}$$

Рассчитали срок хранения сыворотки листериозной при температуре 6 °С, который составил 2607 сут (7 лет).

Таким образом, с помощью метода «ускоренного старения» и расчета в программе «МНК и регрессионный анализ Онлайн+графики» показано, что сыворотка листериозная сохраняет чувствительность (специфическую активность) в течение 7 лет при температуре хранения 6 ± 2 °С. Полученные данные по срокам хранения сыворотки листериозной положительно интерпретируются с результатами долгосрочных испытаний сыворотки листериозной, поэтому метод «ускоренного старения» антител может быть успешно использован в качестве ориентира при определении сроков годности МИ. Применение программы «МНК и регрессионный анализ Онлайн+графики» с построением графиков и выводом уравнений регрессии значительно облегчает расчет прогнозирования сроков годности МИ при рекомендуемом температурном режиме хранения.

Стабильность сыворотки листериозной во время транспортирования

При изучении стабильности сыворотки листериозной так же определяли условия транспортирования МИ, при этом должны учитывать климатические зоны мира. Иркутская область относится к зоне I с умеренным климатом, где средняя годовая температура составляет 21 °С и влажность 45 % согласно ОФС.1.1.0009.18 [36].

Изучена стабильность сыворотки листериозной (серии 41, 42, 43) по физико-химическим показателям (внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность и pH), исследование проводили при температурах -20 °С и $+20$ °С в течение 7 сут, результаты представлены в таблице 19.

Как следует из представленных данных, по физико-химическим показателям сыворотка листериозная соответствовала требованиям ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 в течение всего срока исследования.

Таблица 19 – Изучение стабильности сыворотки листериозной агглютинирующей (серий 41, 42 и 43) по физико-химическим показателям

№ п/п	Наименование показателя	Характеристика и норма	Тем- пера- тура, °С	Срок хранения, сут							
				0	1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Внешний вид лио- филизированной сыворотки	Аморфная масса белого цвета с розо- ватым или желтова- тым оттенком	-20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
			+20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
2	Растворимость	В течение 10 мин в 1 мл стерильной ди- стиллированной воды	-20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
			+20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
3	Прозрачность	Прозрачная или слабоопалесцирую- щей	-20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
			+20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
4	Цветность	Светловато- кремового до розо- вато-желтого цвета	-20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
			+20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
5	рН	От 7,5 до 8,5	-20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
			+20	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.

Примечание: «соотв.» – соответствует

Стабильность сыворотки листериозной по показателям чувствительности и специфичности в РРА и ОРА при имитации условий транспортирования в температурных режимах -20 °С и +20 °С и сроках хранения до 7 суток представлены в таблице 20. Чувствительность сыворотки определяли с использованием штаммов: *L. monocytogenes* 3657, *L. monocytogenes* 156 и

L. monocytogenes 1588. Специфичность изучали с применением близкородственных и гетерологичных штаммов: *L. innocua* ба 304004, *L. ivanovii* 97к-88, *E. coli* ATCC 25922, *Sh. flexnery* 170, *S. Typhimurium* 21, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. aureus* 6538 и *Y. enterocolitica* O3.

Таблица 20 – Результаты изучения стабильности сыворотки листериозной аг-
глютинирующей по показателям чувствительности и специфичности в РРА и
ОРА в условиях транспортирования

[illegible]

Продолжение таблицы 20

43	Чувствительность	Сыворотка должна агглютинировать штаммы: <i>L. monocytogenes</i> 3657, <i>L. monocytogenes</i> 156, <i>L. monocytogenes</i> 1588	-20	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100
			+20	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100	1:1600/ 1:100
	Специфичность	Сыворотка не должна агглютинировать штаммы в разведении: <i>L. innocua</i> 6а 304004, <i>L. ivanovii</i> 97к-88, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>Sh. flexneri</i> 170, <i>S. Typhimurium</i> 21, <i>S. Enteritidis</i> Gartneri, <i>S. aureus</i> 6538, <i>Y. enterocolitica</i> O3	-20	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
			+20	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—

Примечание: титры антител в РРА и ОРА на 3-4 креста, «—» – отрицательная РА

Согласно полученным данным, при определении чувствительности со штаммами: *L. monocytogenes* 3657, *L. monocytogenes* 156 и *L. monocytogenes* 1588 титры антител РРА оставались на исходном уровне для серии 41, 42 и 43 – 1:1600 на 3-4 креста, положительный результат в ОРА (1:100) наблюдали во всех образцах исследуемых сывороток листериозных. При изучении специфичности сыворотки листериозной со штаммами: *L. innocua* 6а 304004, *L. ivanovii* 97к-88, *E. coli* ATCC 25922, *Sh. flexneri* 170, *S. Typhimurium* 21, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. aureus* 6538 и *Y. enterocolitica* O3 в ОРА и РРА получили отрицательный результат.

Таким образом, при проведении комплексного исследования трех серий сыворотки листериозной, находившейся в условиях имитации транспортирования МИ при температурах -20 °С и +20 °С в течение 7 суток сохраняла основные качественные показатели (внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность и рН), чувствительность и специфичность в соответствии требованиям ТУ 21.20.23-015-01898090-2018. Полученные результаты свидетельствуют о возможности транспортирования сыворотки листериозной в температурном диапазоне -20 °С и +20 °С в течение 7 суток.

Изучение стабильности сыворотки листериозной после восстановления

При использовании сыворотки листериозной предполагается ее хранение в восстановленной форме в течение определенного периода времени в лабораторных условиях. Для этого необходимо установление срока применения, в течение которого восстановленная сыворотка листериозная сухая соответствует требованиям ТУ 21.20.23-015-01898090-2018.

Определение стабильности восстановленной сыворотки проводили в лабораторных условиях в течение 32 ч при температуре хранения 6 ± 2 °С. Изменения титра антител сыворотки листериозной при хранении в течение 32 ч показаны в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты изучения стабильности сыворотки листериозной агглютинирующей после восстановления

№ п/п	Серия сыворотки	Титры антител в РРА/ОРА							
		Время хранения, ч.							
		4	8	12	16	20	24	28	32
1	41	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400 /1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:50
2	42	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400 /1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:50
3	43	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400 /1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:50	1:200/ 1:50

Примечание: титры антител в РРА и ОРА (1:400/1:100) на 3-4 креста

При изучении сыворотки листериозной серий 41, 42 и 43 титры антител в РРА составили 1:400 на 3-4 креста в течение 28 ч хранения. Наблюдали снижение титра антител сыворотки листериозной серии 43 в ОРА и РРА через 28 и 32 ч хранения, соответственно.

Таким образом, после восстановления сыворотка листериозная сохраняла свои свойства в течение 24 ч при температуре хранения 6 ± 2 °С.

4.5 Разработка технологической схемы производства сыворотки листериозной агглютинирующей

На основании результатов проведенных исследований нами разработана технологическая схема производства сыворотки листериозной агглютинирующей (Рисунок 11).



Рисунок 11– Технологическая схема производства сыворотки листериозной агглютинирующей

Технология производства сыворотки листериозной агглютинирующей состоит из девяти стадий.

На первой стадии технологического процесса производится наращивание биомассы *L. monocytogenes* 766 на питательной среде для культивирования листерий.

Корпускулярный иммуноген получали на второй стадии технологического процесса из биомассы *L. monocytogenes* 766 инактивированной кипячением при 100 °С в течение 1 ч.

Полученный иммуноген на третьей стадии вводили животным трехкратно в возрастающей концентрации внутривенно по 6, 16 и 25 млрд. м.к./мл и внутримышечно – 500 млн. м.к./мл, с интервалом в три дня.

Четвертая стадия начинается через 15 дней от первой иммунизации продуцентов, для этого проводили пробный забор крови у всех животных для определения титров антител сыворотки листериозной в РРА. На 21 день забирали кровь и определяли титр антител сыворотки листериозной в РРА. Если титр специфических антител составлял не ниже 1:800, кроликам проводили первое кровопускание из краевой вены уха, на следующий день – второе кровопускание. От одного кролика получали 80±10 мл иммунной крови. Пробирки с кровью помещали в термостат при температуре 37±1 °С на 1 ч, затем пипеткой по стенке цилиндра обводили кровяной сгусток и кровь выдерживали в холодильнике при температуре 6±2 °С в течение 20 ч для выхода большего объема сыворотки.

Сыворотку листериозную консервировали добавлением борной кислоты в количестве 15 г/л на пятой стадии технологического процесса.

На шестой стадии, через 18-24 ч в сыворотку листериозную добавляли стабилизаторы сахарозу и тиосульфат натрия, в концентрации 30 г/л и 10 г/л, соответственно.

Седьмая стадия технологического процесса включает фильтрацию сыворотки через стерилизующие фильтры Сарботран. Контроль качества сыворотки листериозной проводили по физико-химическим показателям (внеш-

ний вид, растворимость, прозрачность, цветность, рН, потеря в массе при высушивании), чувствительность (специфическая активность), специфичность и стерильность.

На восьмой стадии технологического процесса сыворотку листериозную разливали дозатором в ампулы по 1 мл. Далее препарат высушивали на сублимационной установке LP10R (Ilshin, Корея), для этого сыворотку листериозную замораживали при температуре -45 ± 5 °С в течение 4 ч, при этом температура сыворотки листериозной в ампулах составляла -40 ± 4 °С. Параметры сублимационной сушки: температура конденсатора -65 ± 5 °С, давление от 16 до 4 Па, конечная температура сушки сыворотки листериозной 32 ± 2 °С. Длительность высушивания 24 ± 2 ч.

Герметизацию ампул с сывороткой листериозной проводили на машине шприцевого наполнения и запайки ампул (Новатор, Санкт-Петербург). Контроль качества сыворотки листериозной агглютинирующей проводили в соответствии с требованиями ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 по внешнему виду, растворимости, прозрачности, цветности, рН, потери в массе при высушивании, герметизации, микробиологической чистоте, чувствительности и специфичности.

Конечной стадией технологического процесса производства сыворотки листериозной агглютинирующей является маркировка, упаковка и сдача готовой продукции на склад.

4.6 Апробация сыворотки листериозной агглютинирующей

Проведены испытания сыворотки листериозной агглютинирующей на базе Референс-центра по мониторингу за листериозом (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск) со штаммами *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. и гетерологичными штаммами. При проведении исследований использовали экспериментальную сыворотку листериозную серии 44.

Чувствительность сыворотки листериозной оценивали по способности идентифицировать наличие *L. monocytogenes* в исследуемом материале и

определяли, как процент положительных результатов анализа при постановке РА с 28 штаммами *L. monocytogenes*, 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 страны (Московская, Ярославская, Тверская, Орловская, Белгородская, Ростовская и Вологодская области) (Таблица 22).

Таблица 22 – Определение чувствительности сыворотки листериозной в РА со штаммами *L. monocytogenes*

№ п/п	Штамм	Название штамма	№ в коллекции ГКПМ	Регион Выделения	Источник выделения	ОРА	РРА
						1:100	1:400
1	<i>L. monocytogenes</i>	BB-1	В 7495	г. Ярославль	Клинический материал	4+	4+
2	<i>L. monocytogenes</i>	MIB-871	В 7909	г. Москва	Клинический материал	3+	4+
3	<i>L. monocytogenes</i>	TVe № 1895	В 8359	г. Тверь	Мясной полуфабрикат	3+	4+
4	<i>L. monocytogenes</i>	TVe № 2269	В 8360	г. Тверь	Рыбный полуфабрикат	4+	4+
5	<i>L. monocytogenes</i>	OR-513	В8702	г. Орел	Клинический материал	4+	4+
6	<i>L. monocytogenes</i>	OR-517	В 8701	г. Орел	Клинический материал	4+	4+
7	<i>L. monocytogenes</i>	Bel-1	В 8700	г. Белгород	Клинический материал	4+	4+
8	<i>L. monocytogenes</i>	MO-um	В 8699	Московская Область	Клинический материал	3+	4+
9	<i>L. monocytogenes</i>	MO-Ob	В 8698	Московская Область	Клинический материал	4+	4+
10	<i>L. monocytogenes</i>	ROS 150-1	В 8697	г. Ростов-на-Дону	Мясной полуфабрикат	4+	4+
11	<i>L. monocytogenes</i>	V12	В 8696	г. Вологда	Полуфабрикат	4+	4+
12	<i>L. monocytogenes</i>	V23	В 8695	г. Вологда	Мясной полуфабрикат	4+	4+
13	<i>L. monocytogenes</i>	V30	В 8694	г. Вологда	Полуфабрикат	4+	4+
14	<i>L. monocytogenes</i>	V40	В 8693	г. Вологда	Полуфабрикат	4+	4+
15	<i>L. monocytogenes</i>	V41	В 8692	г. Вологда	Рыбный полуфабрикат	4+	4+
16	<i>L. monocytogenes</i>	V44	В 8691	г. Вологда	Полуфабрикат	4+	4+
17	<i>L. monocytogenes</i>	V59	В 8690	г. Вологда	Мясной полуфабрикат	4+	4+
18	<i>L. monocytogenes</i>	V276-2	В 8689	г. Вологда	Клинический материал	4+	4+
19	<i>L. monocytogenes</i>	V299-1	В 8688	г. Вологда	Клинический материал	4+	4+
20	<i>L. monocytogenes</i>	Water3	В 8687	г. Вологда	Сточные воды	4+	4+
21	<i>L. monocytogenes</i>	Water4	В 8686	г. Вологда	Сточные воды	4+	4+

Продолжение таблицы 22

22	<i>L. monocytogenes</i>	Water5	B 8685	г. Вологда	Сточные воды	4+	4+
23	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC13932	B-7272	Музейный штамм		4+	4+
24	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC10357	B-7271	Музейный штамм		4+	4+
25	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC11994	B-4810	Музейный штамм		4+	4+
26	<i>L. monocytogenes</i>	766/1	B-4908	Музейный штамм		4+	4+
27	<i>L. monocytogenes</i>	766/mxr	B-4909	Музейный штамм		4+	4+
28	<i>L. monocytogenes</i>	766/П	B-4910	Музейный штамм		4+	4+

При исследовании 28 штаммов *L. monocytogenes* в РРА (1:400) наблюдали крупно- и мелкозернистую агглютинацию при полном просветлении жидкости на 4 креста. В ОРА учет результатов проводили в течение 3 мин, положительным считали результат в виде четко выраженного агглютината в капле с сывороткой (1:100). 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 % (нижняя граница 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: *Sh. flexneri* 170, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. Typhimurium* 21, *Y. enterocolitica* O3 628/1 (Таблица 23).

Таблица 23 – Определение специфичности листериозной сыворотки в РА с представителями *Listeria* spp. и гетерологичными штаммами

№ п/п	Вид микроорганизмов	Название штамма	№ в коллекции ГКПМ	ОРА
				1:100
1	<i>L. welschimerii</i>	B-107	B-8157	-
2	<i>L. welschimerii</i>	4911	B-4911	-
3	<i>L. welschimerii</i>	Ярославль3	B-7499	-
4	<i>L. innocua</i>	ATCC33090	B-7274	-
5	<i>L. innocua</i>	B-64	B-8155	-
6	<i>L. innocua</i>	M4	B-6643	-
7	<i>L. ivanovii</i>	ATCC19119	B-7381	-
8	<i>L. ivanovii</i>	7842	B-7759	-
9	<i>L. ivanovii</i>	11840	B-4912	-
10	<i>L. seeligeri</i>	ATCC35967	B-7767	-
11	<i>L. seeligeri</i>	SLSC5981	B-7385	-
12	<i>L. seeligeri</i>	LSC3954	B-7386	-
13	<i>L. grayi</i>	ATCC25400	B-7768	-
14	<i>L. grayi</i>	MKM2	B-7384	-
15	<i>L. grayi</i>	ИП	-	-
16	<i>L. murrayi</i>	G-44	-	-
17	<i>Sh. flexneri</i>	170	-	-
18	<i>E. coli</i>	ATCC25952	-	-
19	<i>Y. enterocolitica</i> O3	628/1	-	-
20	<i>S. Typhimurium</i>	21	-	-
21	<i>S. Enteritidis</i>	Gartneri	-	-
22	<i>S. aureus</i>	6538	-	-

Примечание: «-» –отрицательная РА

В результате проведенных исследований получены отрицательные результаты с 16 штаммами *Listeria* spp: *L. welschimerii*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. grayi* (subs murray) и 6 гетерологичными тест-штаммами *Sh. flexneri*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*. В РРА наблюдали отсутствие зонтика и просветление жидкости в пробирках, в ОРА микробная взвесь исследуемых штаммов оставалась равномерно мутной без 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 %.

Проведена апробация сыворотки листериозной агглютинирующей (серия № 44) со штаммами *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. и гетерологичными штаммами на базе Референс-центра по мониторингу за листериозом (ФБУН

ГНЦ ПМБ) и определена оценка ее эффективности по показателям чувствительности и специфичности. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности сыворотки листериозной агглютинирующей и возможности её применения в клинической лабораторной диагностике для обнаружения возбудителя листериоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Листериоз – 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 у новорожденных и лиц с иммунодефицитом. У людей заболевание протекает с тяжелым клиническим течением и летальностью до 40 %. В настоящее время листериоз регистрируют в различных географических и природных зонах всех континентов, более чем в 65 странах мира [57]. Рост заболеваемости листериозом обуславливает необходимость усовершенствования лабораторной диагностики инфекции, то есть улучшение качества существующих и создание новых иммунобиологических препаратов для клинических и микробиологических исследований.

В практике лабораторной диагностики серологические методы исследования листериоза остаются востребованными. Одним из специфичных, надежных и доступных экспресс-методов лабораторной диагностики возбудителя листериоза остается реакция агглютинации, для постановки которой необходимы сыворотки листериозные агглютинирующие.

Получение гипериммунной листериозной агглютинирующей сыворотки к *L. monocytogenes* для реакции агглютинации имеет весьма существенное значение, являясь определяющим звеном серологического метода исследования. Не менее актуальна на основе альтернативных панкреатических рыбных гидролизатов разработка питательной среды для культивирования листерий, которая используется в производстве сыворотки листериозной с целью накопления биомассы *L. monocytogenes* 766 при получении иммуногена. Также, возможно использование среды СКЛ при длительном хранении рабочих коллекций культур листерий.

Для изучения ростовых свойств сухих питательных основ и СКЛ, а также в качестве иммуногена для иммунизации кроликов-продуцентов сыво-

ротки листериозной использован референс-штамм *L. monocytogenes* 766, обладающий типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.

Проведена оценка эффективности ферментативного гидролиза по степени накопления аминного азота в ПГ сельди тихоокеанской, минтая, сороги и кальмара европейского. Значительное накопление аминного азота наблюдали во всех полученных панкреатических гидролизатах в первые 6 сут в среднем на $547,5 \pm 27,5$ мг% (с приростом на 27,3 %). 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. Наибольшее содержание аминного азота определено в ПГ сороги и составило 590 мг%. По окончании процесса ферментативного гидролиза значения рН исследуемых питательных основ составляли от 7,13 до 7,68.

Результаты ЯМР-спектроскопии показали, что панкреатические гидролизаты сельди, минтая, сороги и кальмара содержали основные аминокислоты: аланин, валин, треонин, аргинин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, глицин, которые удовлетворяют питательные потребности листериозного микроба, в незначительных количествах обнаружены гистидин, тирозин и триптофан.

На основе полученных сухих ПГ сельди, минтая, сороги и кальмара сконструированы четыре варианта экспериментальных питательных сред. Установлено, что при культивировании на экспериментальных питательных средах тест-штамм *L. monocytogenes* 766 сохранял типичные культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства, получен положительный результат в ОРА – 1:100 на 4 креста с сывороткой листериозной агглютинирующей (серия 43). При изучении специфической активности пи-

тательных сред по показателям прорастания, чувствительности и стабильности микроорганизма не имели существенных различий между собой. Скорость роста *L. monocytogenes* 766 на питательных средах на основе ПГ сельди и сороги составила 18 ч, при этом отмечали отчетливо видимый «росинчатый» рост культивируемого штамма, на других двух средах рост определен через 24 ч. При инкубации в течение 48 ч наблюдали увеличение размера колоний тест-штамма *L. monocytogenes* 766 до 4,0 мм на питательной среде с ПГ сороги. По эффективности питательная среда вариант № 3 на основе ПГ сороги ($4,7 \times 10^9$ м.к./мл) превосходила в среднем на 41,3 % варианты № 1, 2 и 4.

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).

Проведенные исследования позволили определиться с выбором питательной основы для конструирования питательной среды для культивирования листерий. На основе полученных данных разработан качественно-количественный состав питательных сред с использованием панкреатических гидролизатов сороги и отходов производства мясной воды. В панкреатических гидролизатах сороги и отходов производства мясной воды определено

качественное и количественное содержание 19 аминокислот (метионин, фенилаланин, треонин, лейцин, аргинин, лизин, гистидин, валин, изолейцин, цистин, серин, аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая кислота, пролин, аланин, тирозин, цитрулин и орнитин), из них четыре основные аминокислоты являются факторами роста листерий – аргинин, гистидин, изолейцин и глутаминовая кислота.

Изготовлены варианты питательных сред с различным составом и соотношением компонентов: ГОПМВ (версии №1 и 2), ПГ сороги (версия № 3). Изучены их ростовые свойства при культивировании тест-штамма *L. monocytogenes* 766, в сравнении с контрольной средой МПА с 1 % глюкозой.

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. Культивируемый тест-штамм *L. monocytogenes* 766 на трех версиях питательных сред обладал типичными для листерий культурально-морфологическими свойствами; в окрашенном мазке – короткие грамположительные палочки с закругленными концами. При изучении серологических свойств штамма *L. monocytogenes* 766 получен положительный результат в ОРА – 1:100 на 4 креста с сывороткой листериозной агглютинирующей (серия 43). Тест-штамм *L. monocytogenes* 766 ферментировал рамнозу и не утилизировал маннит и ксилозу, что соответствовало 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.

Наибольший показатель эффективности 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 % по сравнению с версиями № 1 – $3,4 \times 10^9$ м.к./мл и № 2 – $3,0 \times 10^9$ м.к./мл.

Сравнительная оценка специфической активности сконструированных питательных сред показала, что 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).

Питательная среда СКЛ обеспечивает сохранение культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств производственного штамма тест-штамма *L. monocytogenes* 766 при хранении в течение 12 мес.

Из биомассы *L. monocytogenes* 766, культивированной на питательной среде СКЛ, путем инактивации кипячением при температуре 100 °С в течение 1 ч, получен корпускулярный антиген (иммуноген). Иммуноген применяли при иммунизации кроликов-продуцентов в производстве сыворотки листериозной агглютинирующей.

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 предусматривался полный адъювант Фрейнда (ПАФ), 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, *S. aureus* ATCC 6538, *S. Enteritidis* Gartneri, *S. Typhimurium* 21, *S. flexneri* 170, *Y. enterocolitica* ОЗ 628/1) агглютинация в ОРА и РРА отсутствовала.

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.

Длительное стабилизирующее действие на сыворотку листериозную оказывает комбинация сахарозы и тиосульфата натрия, из расчета 30 и 10 г/л, соответственно. Стабильность сыворотки листериозной с 3 % сахарозой и 1 % тиосульфатом натрия возросла в 5,6 раза в сравнении с контрольным образцом. Применение данных стабилизаторов увеличило растворимость сыворотки листериозной до 1 мин. Остаточная влажность стабильна и составляла не более 2,5 %.

По результатам долгосрочных испытаний сыворотки листериозной (серий 41, 42 и 43) подтвержден регламентированный срок годности медицинского изделия – 5 лет при температуре 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (контроль) в течение 7 сут диагностические титры антител в сыворотках оставались на исходном уровне РРА – 1:400 и ОРА – 1:100.

Изучение стабильности сыворотки листериозной после восстановления показало, что растворенную рабочую сыворотку можно хранить при температуре от $6\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и использовать в течение 24 ч.

На основании результатов исследований разработана технологическая схема производства гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей. 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). По технологической схеме производства получено 10 экспериментально-производственных серий сыворотки листериозной агглютинирующей.

Проведена апробация на базе Референс-центра по мониторингу за листериозом (ФБУН ГНЦ ПМБ) сыворотки листериозной агглютинирующей (серия № 44) со штаммами *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. и гетерологичными штаммами и дана оценка ее эффективности по показателям чувствительности и специфичности. При исследовании 28 штаммов *L. monocytogenes*, 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 %.

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 просветления и зонтика в пробирках, в ОРА микробная взвесь исследуемых штаммов оставалась равномерно мутной без 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 %.

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 °C в течение 5 лет. Предложено внесе-

ние 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверкина, Р.А. Получение иммунных сывороток. В кн.: Руководство по иммунологии / Р.А. Аверкина. – М., 1973. – 188 с.
2. Александрова, Н.М. ПЦР тест-система для обнаружения генома возбудителя листериоза / Н.М. Александрова, Т.Х. Фаизов, К.В. Усольцев // Ученые записки Казанской Государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т. 216. – С. 23-27.
3. Андреевская, Н.М. Получение и оценка пригодности липогликопротеида холерного вибриона для производства холерной агглютинирующей О-сыворотки. Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Андреевская Нина Михайловна. – Иркутск, 1987. – 131 с.
4. Арзымбетова, Ж.Х. Лабораторная диагностика листериоза / А.Т. Ахметова, К.Ж. Нургалиева // Батыс Қазақстан медицина журналы. – 2011. – № 2 (30). – С. 12-15.
5. Артюхин, В.И. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред / В.И. Артюхин, А.П. Шепелин, Н.В. Киселева // Производство и применение продуктов микробиологических производств: обзорн. информ. – 1990. – Вып. 9-10. – С. 53-72.
6. Асенова, Л.Х. Эпидемиологические особенности листериоза: учебно-методическое пособие / Л.Х. Асенова– Караганда, 2012. – 64 с.
7. Ахапкина, И.Г. Культивирование *Pseudomonas aeruginosa* на средах с использованием ферментативного гидролизата хлореллы в качестве питательной основы / И.Г. Ахапкина, Л.П. Блинкова, Л.Г. Бутова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2002. – № 5. – С. 67-68.
8. Бакулов, И.А. Листерии и листериоз. Монография / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева [и др.]. – Ульяновск: НИИЦМиБ, 2016. – 334 с.
9. Бакулов, И.А. Листериоз сельскохозяйственных животных. – М.: Колос. – 1967. – 296 с.

10. Бакулов, И.А. Эпидемиологические и эпизоотологические аспекты листериоза / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Т.И. Шестиперова // Журн. Микробиол. – 1994. – № 5. – С. 100-105.
11. Банникова, Д.А. Выживаемость и морфология популяций листерий в молочных продуктах (СЭМ) / Д.А. Банникова, И.Б. Павлова, А.А. Власов // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2010. – № 3. – С.81-88.
12. Батаева, Д.С. Применение ускоренных микробиологических методов для определения патогенных листерий в мясе / Д.С. Батаева, А.Ю. Нечаев // Все о мясе. – 2007. – № 3. – С. 27-28.
13. Беляева, Н.М. Листериоз: этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение: учеб. пособие / Н.М. Беляева, Н.Н.Цурикова, И.П.Трякина. – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2014. – 56 с.
14. Белясова, В.И. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / Белясова В.И. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2012. – № 4 (12). – С. 99-121.
15. Бердасова, А.С. Образование биопленки *Listeria monocytogenes* в консорциуме с сапрофитными бактериями: В кн.: матер. всерос. симп. с межд. Учасг. – М.: 2012 – 34 с.
16. Берёзкина, Г.В. Диагностическая эффективность листериозного эритроцитарного антигенного диагностикума / Г.В. Берёзкина, Н.М. Никитюк, И.Н. Филимонова, Э.Ф. Опочинский // ЖМЭИ. – 1993. – № 6. – С. 93-94.
17. Биргер, М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М.О. Биргер. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина. – 1982. – 461 с.
18. Бланков, Б.И. Применение лиофилизации в микробиологии / Б.И. Бланков, Д.Л. Клебанов. – М.: Медгиз. – 1961. – 263 с.
19. Богатыренко, Е.А. Исследование способности *Listeria monocytogenes* формировать биопленки в консорциуме с сапрофитными бактериями / Е.А.

Богатыренко, Л.С. Бузолева, А.С. Бердасова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – 1417 с.

20. Борисочкина, Л.И. Технология продуктов из океанических рыб / Л.И. Борисочкина, Т.А. Дубровская. - М.: Агропромиздат. – 1988. – 209 с.

21. Бубеев, А.Т. Технология получения основы микробиологических питательных сред / А.Т. Бубеев, Т.Е. Данилова, В.Ж. Цыренов // Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2005. – 4.1. – С. 320-321.

22. Бузолева, Л.С. Факторы, способствующие выживанию возбудителей сапрозоонозов в морской среде / Л.С. Бузолева, А.М. Кривошеева, Е.А. Богатыренко, А.В. Ким // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11 (ч. 11) – С. 2426-2428.

23. Бузолева, Л.С. Формирование биопленок бактериями *Listeria monocytogenes* разных серовариантов в ассоциации с *Bacillus pumilus* / Л.С. Бузолева, Н.Б. Цветкова, Е.А. Богатыренко // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 293-299.

24. Вартанова, Н.О. Создание новой синтетической среды для культивирования *Helicobacter pylori* / Н.О. Вартанова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 139, № 5. – С. 538-543.

25. Васильев, Д.А. Идентификация бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* методом мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, А.В. Мاستиленко // Биотика. – 2014. – №1 (1). – С. 3-6.

26. Васильев, Д.А. Разработка системы молекулярно-генетической детекции бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* / Д.А. Васильев, А.В. Мастыленко, Е.Н. Ковалева // Вестник Ульяновской Государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25). – С.43-46.

27. Власов, А.А. Выживаемость и морфология листерий в тканях растений кормового овса / А.А. Власов, И.Б. Павлова // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 4. – С. 89-92.

28. Воронина, О.Л. Анализ спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе / О.Л. Воронина, И.С. Тартаковский, Н.Д. Ющук [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – Т. 97, № 6. – С. 546-555. doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-5
29. Гальцева, Г.В. Лабораторная диагностика листериоза / Г.В. Гальцева, Л.М. Федоренко, В.Б. Инжеватова, Е.Е. Буланова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 1. – С. 52-53.
30. Гариб, Ф.Ю. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина / Ф.Ю. Гариб, А.П. Ризопулу // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 3. – С. 581-596.
31. Гдалевский, Г.Я. Исследования стабильности иммуноглобулиновых препаратов и пути ее повышения: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Гдалевский Гарик Яковлевич. – Ленинград, 1980. – 24 с.
32. Гершун, В.И. Экология листерий и пути их циркуляции в природном очаге / В.И. Гершун // Экология возбудителей сапронозов. – М., 1998. – С. 80-85.
33. Глушанова, Н.А. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // Медицина в Кузбассе. – 2015. – Спецвып. 2. – С. 30-35.
34. Годова, Г.В. Формирование биопленок *Listeria monocytogenes* при взаимодействии с клетками овощных культур / Г.В. Годова, В.И. Пушкарева, Е.А. Калашникова [и др.] // Известия ТСХА. – 2013. – № 5. – С. 50-58.
35. ГОСТ 10444.1-84 Консервы приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе. – М.: Стандартиформ, 2010. – 228 с.
36. ГОСТ 32031-2012 Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*. – М.: Стандартиформ, 2014. – 26 с.
37. Государственная фармакопея. XIV издание. - М.: Выпуск 2. 2018
38. Детушев, К.В. Сравнение методов прямого нанесения биомассы и белковых экстрактов при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* мето-

- дом MALDI-TOF-типирования / К.В. Детушев, А.Г. Богун, Т.Н. Мухина, В.И. Соломенцев // Бактериология. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 28-33.
39. Джейн, Д.М. Современная пищевая микробиология / Д.М. Джейн, М.Д. Лёсснер, Д.А. Гольден – М.: БИНОМ, 2011. – 886 с.
40. Дятлов, И.А. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особоопасных инфекций бактериальной природы / И.А. Дятлов, В.В. Кутырев, М.В. Храмов. – М., 2012. – 415 с.
41. Егоров, А.Г. Рыбы водоемов юга Восточной Сибири (карпообразные, трескообразные, окунеобразные) / А.Г. Егоров. – Иркутск: Изд-во Иркут. Университета, 1988. – 321 с.
42. Егорова, И.Ю. Дикие животные как источник пищевых токсикоинфекций человека / И.Ю. Егорова, В.А. Цыбанова // Ветеринарная патология. – 2011. – №4 (38). – С. 45-48.
43. Еремушкина, Я.М. Листерия как одна из причин неблагоприятных исходов у пациентов с иммуносупрессивными состояниями / Я.М. Еремушкина, Т.К. Кускова, Т.Ю. Смирнова // Лечащий врач. – 2020. – № 4. – С.60-63.
44. Еськова, А.И. Биотические факторы среды, влияющие на выживаемость листерий в морских экосистемах / А.И. Еськова, Л.С. Бузолева, А.В. Ким [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5 – 294 с.
45. Зайцева, Е.А. Дифференциация штаммов *Listeria monocytogenes* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции / Е.А. Зайцева, С.А. Ермаева // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С.40-42.
46. Зайцева, Е.А. Листерия: методы лабораторной диагностики / Е.А. Зайцева, Р.Н. Диго. – Владивосток: Медицина ДВ, 2017. – 168 с.
47. Зайцева, Е.А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоковирулентных штаммов *Listeria monocytogenes*: дисс. ... д-ра мед. наук: 03.00.07 / Зайцева Елена Александровна. – Москва, 2010. – 299 с.

48. Зарубин, Н.Ю. Получение сухих высококачественных рыбных гидролизатов с использованием вакуумной сублимационной сушки / Н.Ю. Зарубин, О.В. Бредихина, Г.В. Семёнов, И.С. Краснова // Вестник АГТУ. – 2016. – № 3. – С. 138-144.
49. Ибрагимова, М.А. Современные аспекты листериозной инфекции / М.А. Ибрагимова // Вестник Алматинского государственного института усовершенствования врачей. – 2016. – № 1 – С. 84-91.
50. Иманмадинова, Г. Эффективность гипериммунной сыворотки против листериоза овец / Г. Иманмадинова, Б.К. Бияшев, Ж.С. Киркимбаева, Д.А. Сарыбаева, Г.М. Нургожаева, М.Д. Булегенова / Приоритетные векторы развития промышленности и сельского хозяйства: матер. III Международной научно-практической конф. – Макеевка, 2020. – С. 57-61.
51. Калягина, С.Ю. Разработка микробиологической питательной среды из утильного мясного сырья: дис. ... канд. биол. наук 03.00.07 / Калягина Светлана Юрьевна. – М., 2008. – 134 с.
52. Карнеева, Ж.Н. Листериоз / Ж.Н. Карнеева, О.И. Симонова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2016. – № 4. – С. 69-71.
53. Карпова, Т.И. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* / Т.И. Карпова, С.А. Ермолаева, И.В. Лопырев [и др.] // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2001. – Т. 3, № 3 – С. 266-273.
54. Карпова, Т.И. Идентификация и типирование *Listeria monocytogenes* на основе полиморфизма и экспрессии генов факторов патогенности: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Карпова Татьяна Игоревна. – М., 2003. – 98 с.
55. Киреева, М.Н. Изучение стабильности антигенных компонентов чумной химической вакцины (Ф1+ОСА) в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия / М.Н. Киреева, Т.М. Тараненко, Т.А. Храмченкова [и др.] // Проблемы особоопасных инфекций. – 2009. – Вып. 99. – С. 70-74.
56. Ключникова, Л.А. Качество и безопасность малоценного рыбного сырья Забайкалья / Л.А. Ключникова, В.Н. Лузан / Техника и технологии про-

дуктов питания: Наука. Образование. Достижения. Инновации: матер. Международной научно-практической конф. – Улан-Удэ, 2014. – С. 171-174.

57. Ковалев, В.А. Заболеваемость листериозом в Российской Федерации / В.А. Ковалев, Н.Н. Филатов, Е.Н. Алешина, Е.Г. Симонова // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2019. – Т. 7, № 4. – С. 509-517. doi:10.23888/HMJ201974509-517

58. Козельцева, Е.И. Отличительные особенности выделения и идентификации *Listeria monocytogenes* из рыбы и рыбной продукции / Е.И. Козельцева, И.М. Почицкая, И.Е. Лобазова, Э.А. Петрова // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2016. – № 3. – С.41-44.

59. Костенко, Ю.Г. Листерии - критерий безопасности мясных продуктов / Ю.Г. Костенко, Т.С. Шагова, К.С. Янковский // Мясная индустрия. – 1997. – № 3. – С. 23-24.

60. Костенко, Ю.Г. Микробиологическая среда для выращивания и диагностики бактерий рода *Listeria* / Ю.Г. Костенко, А.Д. Неклюдов; Т.С. Шагова; А.Н. // Патент РФ №2118363. 27.08.1998.

61. Кладова, О.В. К вопросу дифференциальной диагностики листериоза / О.В. Кладова, А.Е. Анджель, Ю.В. Компаниец, Н.Л. Гришкевич. // Детские инфекции. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 61-66. doi.org/10.22627/2072-8107-2019-18-3-61-66

62. Кузнецов, В.И. Приготовление питательных основ для микробиологических целей из речной рыбы / В.И. Кузнецов, О.Г. Татарникова, М.П. Маевский [и др.] // Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера: матер. III Российской науч. конф. с международным участием. – Новосибирск, 2006. – С. 292.

63. Кузнецов, В.И. Результаты испытания сухой питательной среды для выделения листерий / В.И. Кузнецов, Н.Г. Гефан, О.Г. Татарникова [и др.] // Байгалийн голомтот халдварт овчин судланын ундэсний тов. Эрдэм шинжилгээний бүтээл. – Улаанбаатар, 2008. – С. 292-296.

64. Курилова, А.А. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций / А.А. Курилова, Т.В. Таран, Л.С. Катунина, С.И. Головнева // Проблемы особоопасных инфекций. – 2009. – Вып. 101. – С. 66-68.
65. Лабинская, А.С. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова, С.М. Иванова. – М.: БИНОМ, 2022. – 1152 с.: ил.
66. Левковитс, И. Методы исследования в иммунологии / И. Левковитс, Б. Пернис. — М.: Мир, 1981. – 485 с.
67. Литвин, В.Ю. Сапронозы как природно-очаговые болезни / В.Ю. Литвин, Г.П. Сомов, В.И. Пушкарева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – №1 (50). – С. 10-16.
68. Литусов, Н.В. Физиология бактерий: учебное пособие / Н.В. Литусов – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2015. – 43 с.
69. Лузина, Е.В. Оценка некоторых физических свойств и стабильности референс-реагентов диагностических агглютинирующих эшерихиозных ОК-иммуноглобулинов / Е.В. Лузина, Л.Б. Богоявленская, Л. Иванова, Л. Страхилов // Журнал микробиология, эпидемиология, иммунобиология. – 1982. – № 9. – С. 114-115.
70. Лучшев, И.В. Листерия / И.В. Лучшев, В.В. Никифоров, С.В. Бурова, [и др.] // Лечебное дело. – 2005. – № 2. – С. 71-76.
71. Манзенюк, И.Н. Недостатки технического регулирования в сфере обращения медицинских изделий для диагностики *in vitro* в Российской Федерации: состояние и предлагаемые решения / И.Н. Манзенюк, Г.А. Шипулин, В.В. Меньшиков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – № 2. – С. 57-63.
72. Марданлы, С.Г. Проблемы обращения медицинских изделий для *in vitro*-диагностики / С.Г. Марданлы // Вестник МГОУ. – 2014. – № 2. – С. 86-94.

73. Меджидов, М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам / М.М. Меджидов. – М.: Медицина, 2003. – 205 с.
74. Методические рекомендации по верификации статистической достоверности результатов оценки показателей эффективности *in vitro* диагностики. – Иркутск: ИНЦХТ, 2021. – 24 с.
75. Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей. – М., 1987. – 57 с.
76. Методы общей бактериологии: пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта [и др.] – М.: Мир, 1984. – 472 с.
77. Митрофанова, Н.Н. Иммунология: Учебно-методическое пособие для студентов мед. вузов / Н.Н. Митрофанова, В.Л. Мельников. – Пенза, 2013. – 72 с.
78. Михайлова, В.А. Разработка технологии получения кроличьей холерной агглютинирующей О-сыворотки: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Михайлова Вера Александровна. – Иркутск, 1997. – 126 с.
79. Монцевичюте-Эрингене, Е.В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе / Е.В. Монцевичюте-Эрингене // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1964. – Т. 8, № 1. – С. 71-78.
80. МУ 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. – М., 2008. – 66 с.
81. МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям – М., 1996. – 63 с.
82. Мукантаев, К.Н. Получение рекомбинантного антигена р60 *Listeria monocytogenes* / К.Н. Мукантаев, А. Бегалиева, Б. Инірбай [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2015. – № 1. – С. 17-25.
83. Мусаева, А.К. Диагностика листериоза животных и биологические свойства листерий / А.К. Мусаева, Н.Н. Егорова, А.Т. Даугалиева [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 3 (3) – С. 483-489.

84. Мусаева, А.К. Диагностические бактериологические исследования листериоза животных и генотипирование листерий / А.К. Мусаева, Н.Н. Егорова, А.Т. Даугалиева, М.К. Кожабаев // Научное обозрение. Биологические науки. – 2016. – № 1 – С. 83-89.
85. Мягков, Н.А. Атлас – определитель рыб. М.: Изд-во Провещение, 1994. – 282 с.
86. Нафеев, А.А. Случай септико-тифозной формы листериоза /А. А. Нафеев, Н.Н. Сидорова, А.М. Лебедько [и др.] // Клиническая медицина. – 2013. – № 2. – С. 58-59.
87. Некрасова, Ю.Э. Выявление *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах / Ю.Э. Некрасова, Н.С. Боталов, Н.И. Чепкасова // Международный студенческий научный вестник. – 2018. – № 4 (4). – С. 592-594.
88. Нечаев, В.Н. Российские производители медицинских изделий для диагностики *in vitro* о проблемах в отрасли / В.Н. Нечаев, И.Н. Манзенюк, Г.А. Шипулин [и др.] // Современная лабораторная диагностика. – 2015. – № 3 (17). – С. 25-29.
89. Никитин, Е.Е. Замораживание и высушивание биологических препаратов / Е.Е. Никитин, И.В. Звягин. – М.: Колос, 1971. – 343 с.
90. Нитяга, И.М. Контаминация листериями мясных продуктов, и их ускоренная идентификация с применением методов на основе ПЦР / И.М. Нитяга // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2016. – № 1(17). – С. 17-22.
91. Номоконова, Т.Ю. Реконструкция рыбного промысла на озере Байкал (анализ ихтиофауны со стоянки Итырхей) / Т.Ю. Номоконова, Р. Лозей, О.И. Горюнова // Российская археология. – 2009. – № 3. – С. 12-21.
92. Олещенко, Е.П. Листерии как возбудители пищевых инфекций / Е.П. Олещенко, Е.В. Алфёрова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2012. – № 3–4 (49–50). – С. 211-212.
93. Омарова, С.М. Биологические свойства штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных на новых отечественных селективных питатель-

ных редах из клинического материала при диагностике листериоза беременных и новорожденных / С.М. Омарова, Р.И. Исаева // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 145-149.

94. Омарова, С.М. Питательные среды для изучения биологических свойств листерий / С.М. Омарова, Э.М. Ахмедова, П.М. Муртазалиева // Журнал микробиологии. – 2007. – № 3. – С. 95-97.

95. Определитель бактерии Берджи / Под ред. Дж. Хоулта [и др.] – М.: Мир. – 1997. – С. 429.

96. Осипова, Н.И. Экспресс-методы для определения листерий в мясе и мясных продуктах / Н.И. Осипова // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2010. – № 2. – С. 308.

97. Основы биотехнологии производства гипериммунных сывороток [Электронный ресурс]. – Лекции. – 2015. – 249.34 Кб. Режим доступа: <https://studfile.net/preview/2481879/page:2/>

98. Основы микробиологии и иммунологии / Под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: Гэотар-медиа, 2018. – 363 с.

99. Павлова, И.Б. Изучение популяций патогенных листерий в объектах окружающей среды с использованием сканирующей электронной микроскопии / И.Б. Павлова, Д.А. Банникова, А.Б. Кононенко // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 4. – С. 30-34.

100. Перетрухина, А. Т. Бактерийные и вирусные препараты / А. Т. Перетрухина, Е. И. Блинова. – М: Изд-во Академия Естествознания. – 2011. – 311 с.

101. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология / О.К. Поздеев – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2010. – С. 768.

102. Покровский, В.И. Инфекционные болезни и эпидемиология / В.И. Покровский, С.Г. Пак, Н.И. Брико, Б.К. Данилкин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 816 с.

103. Покровский, В.И. Листериоз / В.И. Покровский, Б.А. Годованный // Инфекционные болезни. – 1996. – С. 291-296.

104. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2008. – 352 с.
105. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2003. – 148 с.
106. Пономарева, А.Л. Исследование интенсивности образования биопленок *Listeria monocytogenes* при различных температурах / А.Л. Пономарева // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2016. – № 2 (65) – С. 38-39.
107. Похиленко, В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99-121.
108. Почицкая, И.М. Выявление и идентификация *Listeria monocytogenes* с помощью тест-систем Singlepath® L.'mono / И.М. Почицкая, Е.И. Козельцева, И.Е. Лобазова // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2017. – № 1 (35). – С. 98-102.
109. Пронин, Н.М. Рыбы озера Байкал и его бассейна / Н.М. Пронин, А.Н. Матвеев, В.П. Самусенок [и др.]. – Улан-Удэ: Изд.-во Бурятского научного центра СО РАН, 2007. – 284 с.
110. Пушкарева, В.И. Патогенные листерии в почве и в ассоциации с водорослями: обратимый переход в некультивируемое состояние / В.И. Пушкарева, Е.Н. Емельяненко, В.Ю. Литвин [и др.] // Журн. микробиол. – 1997. – № 3. – С. 3-10.
111. Ржепаковский, И.В. Разработка биостимулятора эмбрионального и оценка его эффективности при иммунодефицитных состояниях у животных раннего возраста: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Ржепаковский Игорь Владимирович. – Ставрополь, 2003. – 170 с.
112. Руководство по вакцинному и сывороточному делу / под ред. П.Н. Бургасова – М.: Медицина, 1978. – 430 с.

113. Руководство по вакцинному и сывороточному делу / под ред. Н.И. Власевского, В.А. Любарского, Л.М. Хатеневера – М.: Государственное издательство биологической и медицинской литературы, 1934. – 608 с.
114. Рыбы и рыбное хозяйство в бассейне озера Байкал / Под ред. М.М. Кожова, К.И. Мишарина. – Иркутск: Кн. изд-во, 1958. – 745 с.
115. СанПин 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. – М., 2021. – 1092 с.
116. Светоч, Э.А. Дифференциация шести видов листерий с помощью ПЦР-ПДРФ анализа ITS-последовательностей, локализованных между генами 16S и 23S рРНК / Э.А. Светоч, Е.И. Асташкин, В.Н. Борзенков [и др.] // Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 1. – С. 46-53.
117. Смирнов, В.В. Научные основы производства диагностических препаратов / В.В. Смирнов, В.Я. Чаплинский, З.М. Андреева, Л.Б. Богоявленская. – Киев: Наукова Думка, 1980. – 195 с.
118. Соколова, О.В. Исследование биопленкообразующей способности *Listeria monocytogenes* / О.В. Соколова, Ю.К. Юшина // Пищевая промышленность. – 2019. – № 4. – С. 94-95.
119. Соколова, О.В. О биопленках листерий / О.В. Соколова, Ю.К. Юшина // Научные подходы к решению актуальных вопросов в области переработки молока: сборник научных трудов к 75-летию со дня основания ВНИИМС. – Углич, 2019. – С. 224-226.
120. Сомов, Г.П. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды / Г.П. Сомов, Л.С. Бузолева. – Владивосток: ОАО «Примполиграфкомбинат», 2004. – 168 с.
121. Спирин, А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А. С. Спирин // Биохимия. – 1958. – Т. 23, вып. 5. – С. 656-662.
122. Стародумова, С.М. Способ быстрой идентификации бактерий рода *Listeria* и патогенного вида *Listeria monocytogenes* с помощью мультиплекс-

ной ПЦР / С.М. Стародумова, Е.А. Зайцева // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. – № 1 (15). – С. 95-97.

123. Старцева, О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения: дис. ... канд. биол. наук 03.00.23 / Старцева Ольга Леонидовна. – Ставрополь, 2005. – 158 с.

124. Супрун, Е.Н. Иммунологическая толерантность: от истории к практике // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2013. – № 3 (34) – С. 29-36.

125. Сыздыкова, Д.М. О роли листерий в патологии беременности и родов / Д.М. Сыздыкова, А.М. Дмитриевский, Н.В. Зубова [и др.] // Вестник КазНМУ. – 2019. – № 4. – С. 5-8.

126. Тамбовцев, Е.П. Методы статистической обработки результатов серологических исследований / Е.П. Тамбовцев, С.Г. Ахметкалиев, Н.Н. Пятницкий // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1969. – № 19. – С. 26-31.

127. Тартаковский, И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И.С. Тартаковский, В.В. Малеев, С.А. Ермолаева. – М.: Медицина для всех, 2002. – 200 с.

128. Тартаковский, И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И.С. Тартаковский // Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия. – 2000. – № 2 (2). – С. 20-30.

129. Татарникова, О.Г. Оценка возможности использования гидролизата речной рыбы при конструировании среды для выделения листерий / О.Г. Татарникова, В.И. Кузнецов, М.П. Маевский [и др.] // Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера. – Новосибирск, 2006. – С. 219.

130. Трошкова, Г.П. Совершенствование технологии приготовления питательных сред на основе ферментативных гидролизатов рисовой и соевой муки / Г.П. Трошкова, Л.Д. Мартынец, Е.В. Кирова [и др.] // Биотехнология. – 2006. – № 4. – С. 74-78.

131. Тюменцев, С.Н. Повышение стабильности холерных О, Инаба, Огава агглютинирующих сывороток / С.Н. Тюменцев, Э.С. Каретникова, Н.М. Андреевская [и др.] // В кн.: Информация проблемно-тематич. комиссии по проблеме «Холера». – Ростов н/Д., 1993. – С. 31-32.
132. Утепешева, А.А. Подбор методов длительного хранения коллекционных штаммов микромицетов и дрожжей / А.А. Утепешева // Экобиотех. – 2019. – Т. 2, № 4. – С. 494-498.
133. Фирсова, Т.Е. Разработка и совершенствование экспресс-метода индикации листерий: дис. ... канд. биол. наук: 16.00.03 / Фирсова Татьяна Евгеньевна. – Щелково, 2005. – 124 с.
134. Фонталин, Л.Н. Иммунологическая толерантность / Л.Н. Фонталин, Л.А. Певницкий – М.: Мир, 1982. – 282 с.
135. Хоменко, Н.А. К изготовлению адсорбированных агглютинирующих сывороток / Н.А. Хоменко, Г.Л. Родионова // Вакцины и сыворотки. – 1965. – Вып. 5. – С. 113-125.
136. Храмов, М.В. Листерия: лабораторная диагностика в современных условиях / М.В. Храмов, Ю.Г. Костенко, Ю.К. Юшина, Д.С. Батаева // Материалы II Национального конгресса бактериологов. – Т. 6, № 3. – 2016. – С. 121.
137. Цаканян, А.В. Листерия / А.В. Цаканян // Медицинская наука Армении НАН РА. – 2009. – № 2. – С. 11-22.
138. Цибизова, М.Е. Изучение технологических свойств рыбных автолизатов, полученных из маломерного сырья Волго-Каспийского бассейна / М.Е. Цибизова, К.В. Костюрина / Вестник АГТУ. – 2010. – № 1. – С. 176-181.
139. Честнова, Т.В. Эпизоотолого-эпидемические аспекты листериоза в Тульской области: дисс. ... канд. биол. наук: 14.00.30 / Честнова Татьяна Викторовна. – Тула, 1999. – 115 с.
140. Чистенко, Г.Н. Листерия: этиология, эпидемиология, профилактика / Г.Н. Чистенко, А.М. Дронова, М.И. Бандацкая // Мир медицины. – 2015. – № 3. – С. 2-5.

141. Шепелин, А. П. Разработка технологии производства панкреатического гидролизата рыбной муки и конструирование на его основе бактериологических питательных сред: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Шепелин Анатолий Павлович. - М., 2013. – 207 с.
142. Шепелин, А.П. Панкреатический гидролизат рыбной кормовой муки – полноценная белковая основа питательных сред / А.П. Шепелин, Л.П. Шолохова, И.И. Марчихина, О.В. Полосенко // Микроорганизмы и биосфера «Microbios-2018: матер. IV Национального конгресса бактериологов и Международного симпозиума. – Омск, 2018. – С. 82-83.
143. Шепелин, А.П. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред / А.П. Шепелин, Л.В. Домотенко, И.А. Дятлов [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60, № 6. – С. 63-65.
144. Abachin, E. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes* / E. Abachin, C. Poyart, E. Pellegrini [et al.] // Mol. Microbiol. – 2002. – № 43. – P. 1-14.
145. Allerberger, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology / F. Allerberger // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2003. – Vol. 35, № 3. – P. 183-189.
146. Andre, P. First isolation of *Listeria welshimeri* in a human / P. Andre, A. Genicot // Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. – 1987. – Vol. 263, № 4. – P. 605-606.
147. Annous, B. A. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures / B.A. Annous, L.A. Becker, D.O. Bayles [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – № 63. – P. 3887-3894.
148. Barbuddhe, S. Biotechnological applications of *Listeria*'s sophisticated infection strategies / S. Barbuddhe, T. Chakraborty // Microb. Biotechnol. – 2008. – Vol. 1, № 5. – P. 361-372.
149. Barbuddhe, S.B. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry / S.B.

Barbuddhe, T. Maier, G. Schwarz [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2008. – Vol. 74, № 17. – P. 5402-5407.

150. Bubert, A. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR / A. Bubert, I. Hein, M. Rauch [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65, № 10. – P. 4688-4692.

151. Burall, L.S. Whole-genome sequencing identifies an atypical *Listeria monocytogenes* strain isolated from pet foods / L.S. Burall, C. Grim, G. Gopinath [et al.] // Genome Announc. – 2014. – Vol. 2, № 6. – P. e01243-14. doi: 10.1128/genomeA.01243-14

152. Butman, B.T. Monoclonal antibodies which identify a genus-specific *Listeria* antigen / Butman B.T., Plank M.C., Durham R.J., Mattingly J.A. // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – Vol. 54, № 6. – P. 1564-1569.

153. Cardenas-Alvarez, M.X. Evidence of hypervirulence in *Listeria monocytogenes* clonal complex 14 / Cardenas-Alvarez M. X., Townsend Ramsett M. K., Malekmohammadi S., Bergholz T. M. // J. Med. Microbiol. – 2019. – № 68. – P. 1677-1685. doi: 10.1099/jmm.0.001076

154. Charlier, C. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study / C. Charlier, É. Perrodeau, A. Leclercq [et.al.] // Lancet Infect. Dis. – 2017. – Vol. 17, № 5. – P. 510-519. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30521-7

155. Chen, J.-Q. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources / J.-Q. Chen, P. Regan, P. Laksanalamai [et al.] // Food Science and Human Wellness. – 2017. – № 6. – P. 97-120.

156. Corrigan, P.J. Pesticide residues in Australian meat / P.J. Corrigan, P. Seneviratna // Veter. Rec. – 1989. – Vol. 125, № 8. – P. 181-184.

157. Cowart, R.E. Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition / R.E. Cowart, B.V. Foster // J. Infect. Dis. – 1985. – Vol. 151, № 4 – P. 721-730.

158. Curiale, M.S. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes* in dairy products, seafoods, and meats: collaborative study / M.S. Curiale, W. Lepper, B. Robison // J. AOAC Int. – 1994. – Vol. 77, № 6. – P. 1472-1489.
159. Destro, M.T. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant / M.T. Destro, M.F. Leita, J.M. Faber // Appl. Environm Microbiol. – 1996. – № 62. – P. 705-711.
160. Dhar, G. Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes* / G. Dhar, K.F. Faull, O. Schneewind // Biochemistry. – 2000. – № 39. – P. 3725-3733.
161. Dubail, I. Listeriolysin O as a reporter to identify constitutive and in vivo-inducible promoters in the pathogen *Listeria monocytogenes* / I. Dubail, P. Berche, A. Charbit // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68, № 6. – P. 3242-3250.
162. Farber, J.M. Alternative approaches to the risk management of *Listeria monocytogenes* in low risk foods / J.M. Farber, M. Zwietering, M. Wiedmann [et. al.] // Food Control. – 2021. – Vol. 123. – P. 1-26. doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107601
163. Farber, J.M. *Listeria monocytogenes* / J.M. Farber // J. Assoc. Off. Anal. Chem. – 1991. – Vol. 74, № 4 – P. 701-704.
164. Farber, J.M. *Listeria monocytogenes*, a foodborn pathogen / J.M. Farber, P.I. Peterkin // Microbiol Rev. – 1991. – Vol. 55, № 3. – P. 476-511.
165. Fecsik, A.J. Studies on antibody production XI. Variation in two antigenic stimuli / A.J. Fecsik, W.T. Bulter, A.H. Coons // J. Exp. Med. – № 120. – 1964. – P. 1041-1049.
166. Fentahun, T. Listeriosis in small ruminants: a review / T. Fentahun, A. Fresebehat // Adv Biol Res. – 2012. – Vol. 6, № 6. – P. 202-209. doi: 10.5829/idosi. abr.2012.6.6.66159
167. Folsom, J.P. Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density and planktonic cell chlorine resistance / J.P. Folsom, J.F. Frank // J. Food Prot. – 2006. – Vol. 69, № 6. – P. 1292-1296.

168. Foong, S.C. Survival and recovery of viable but nonculturable *Listeria monocytogenes* cells in a nutritionally depleted medium / S.C. Foong, J.S. Dickson // J. Food Prot. – 2004. – Vol. 67, № 8. – P. 1641-1645.
169. Fukushima, H. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype 03 inhibited on cefsulodin-irgosan-novobiocin agar / H. Fukushima, M. Gomyoda // J. Clin. Microbiol. – 1986. – Vol. 24, № 1. – P. 116-120.
170. Gailey, J.K. Survival of *Listeria monocytogenes* in a simulated recirculating brine chiller system / J.K. Gailey, J.S. Dickson, W. Dorsa // J. Food Prot. – 2003. – Vol. 66, № 10. – P. 1840-1844.
171. Gasanov, U. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review / U. Gasanov, D. Hughes, P.M. Hansbro // FEMS Microbiology Reviews. – 2005. – Vol. 29, № 5. – P. 851-875. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.002
172. Ghosh, B.K. Isolation, composition, and structure of membrane of *Listeria monocytogenes* / B.K. Ghosh, K.K. Carroll // J. Bacteriol. – 1968. – Vol. 95, № 2. – P. 688-699.
173. Gilot, P. Specific Identification of *Listeria welshimeri* and *Listeria monocytogenes* by PCR assays targeting a gene Encoding a fibronectin-binding Protein / P. Gilot, J. Content // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40, № 2. – P. 698-703.
174. Glaser, P. Comparative genomics of *Listeria* species / P. Glaser, L. Frangeul, C. Buchrieser [et al.] // Science. – 2001. – № 294. – P. 849-852.
175. Gray, M.L. Isolation of *Listeria monocytogenes* from oat silage / M.L. Gray // Science. – 1960. – P. 1767-1768.
176. Guillet, C. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii* / C. Guillet, O. Join-Lambert, A. Le Monnier [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 16, № 1. – P.136-138. doi: 10.3201/eid1601.091155
177. Hitchins, A.D. Critical steps in detection of *Listeria monocytogenes* using the FDA BAM culture methodology / A.D. Hitchins // Lecture on the 5th Annual food pathogen analysis conference. – St. Pete Beach, Florida, 2002.

178. Hodgson, D.A. A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP1 / D.A. Hodgson, K.F. Chater // J. Gen. Microbiol. – 1981. – Vol. 124. – P. 339-348.
179. Jameson, P. Thermal stability of freeze-dried mammalian interferons. Analysis of freeze-drying conditions and accelerated storage tests for murine interferon / P. Jameson, D. Greiff, S.E. Grossberg // J. Cryobiology. – 1979. – № 16. – P. 301-314.
180. Lehner, A. A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR–SSCP in the listeriolysin O (hlyA) locus / A. Lehner, S. Loncarevic, M. Wagner [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 1999. – Vol. 34, № 3. – P. 165-171.
181. Liu, D. Handbook of *Listeria monocytogenes* / D. Liu. – USA: CRC Press. – 2008. – 552 p.
182. Liu, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen / D. Liu // J Med Microbiol. – 2006. – № 55. – P. 645-659. doi: 10.1099/jmm.0.46495-0
183. Locatelli, A. Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil / A. Locatelli, A. Spor, C. Jolivet [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – № 8. – P. e75969. doi: 10.1371/journal.pone.0075969
184. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275.
185. Mandin, P. VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence / P. Mandin, H. Fsihi, O. Dussurget [et al.] // Mol. Microbiol. – 2005. – № 57. – P. 1367-1380.
186. Massacesi, M. Listeriolysin O antibodies detection in pregnant women: results from an Italian pilot study / M. Massacesi, N. Oliva, L. Pucci [et al.] // Ann Ig. – 2019. – № 31. – P. 326-332.
187. McLauchlin, J. An outbreak of human listeriosis associated with frozen sweet corn consumption: Investigations in the UK / J. McLauchlin, H. Aird, C.

- Amar [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2021. – Vol. 338. – doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108994
188. Meinersmann, R. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages / R. Meinersmann, R. Phillips, M. Wiedmann [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, № 4. – P. 2193-2203.
189. Moltz, A.G. Formation of biofilms by under various growth conditions / A.G. Moltz, S.E. Martin // J. Food Prot. – 2005. – Vol. 68, № 1. – P. 92-97.
190. Montero, D. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile / D. Montero, M. Boderó, G. Riveros [et al.] // Front Microbiol. – 2015. – № 6. – P. 384. doi: 10.3389/fmicb.2015.00384
191. Navarre, W.W. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope / W.W. Navarre, O. Schneewind // Microbiol. Mol. Biol. – 1999. – № 63. – P. 174-229.
192. Nightingale, K. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods / K. Nightingale, K. Windham, M. Wiedmann // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, № 16. – P. 5537-5551.
193. Nowak, J. Biofilm formation of the *L. monocytogenes* strain 15G01 is influenced by changes in environmental conditions / J. Nowak, C.D. Cruz, J. Palmer [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 2015. – № 119. – P. 189-195.
194. Orsi, R.H. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics / R.H. Orsi, H.C. Bakker, M. Wiedmann // Review Int J Med Microbiol. – 2011. – Vol. 301, № 2 – P. 79-96.
195. Patel, J.R. Evaluation of enrichment broths for their ability to recover heat-injured *Listeria monocytogenes* / J.R. Patel, L.R. Beuchat // J. Appl. Bacteriol. – 1995. – Vol. 78, № 4. – P. 366-372.

196. Perrin, M. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. / M. Perrin, M. Bemer, C. Delamare // J Clin Microbiol. – 2003. – Vol. 41, № 11. – P. 5308-5309. doi: 10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003
197. Perry, J.D. Evaluation of novel chromogenic substrates for the detection of bacterial β -glucosidase / J.D. Perry, K.A. Morris, A.L. James [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – № 102. – P. 410-415.
198. Phan-Thanh, L. A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria* / L. Phan-Thanh, T. Gormon // Int. J. Food Microbiol. – 1997. – Vol. 35, № 1. – P. 91-95.
199. Piffaretti, J.C. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease / J.C. Piffaretti, H. Kressebuch, M. Aeschbacher [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1989. – № 86. – P. 3818-3822.
200. Pine, L. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species / L. Pine, G.B. Malcolm, J.B. Brooks, M.I. Daneshvar // Can. J. Microbiol. – 1989. – Vol. 35, № 2. – P. 245-254.
201. Portnoy, D.A. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis / D.A. Portnoy, T. Chakraborty, W. Goebel, P. Cossart // Infect. Immun. – 1992. – Vol. 60, № 4. – P. – 1263-1267.
202. Premaratne, R.J. Development of an improved chemical defined minimal medium for *Listeria monocytogenes* / R.J. Premaratne, W. Hin, E.A. Johnson // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57, № 10. – P. 3046-3048.
203. Pucciarelli, M.G. The cell wall of *Listeria monocytogenes* and its role in pathogenicity / M.G. Pucciarelli, H. Bierne, F.G.-del Portillo. – Philadelphia: Springer, 2007. – 281 p.
204. Puga, C.H. Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan / C.H. Puga, C. San Jose, B. Orgaz // Food Control. – 2016. – Vol. 65. – P 143-151. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.01.012
205. Ralovich, B.S. Further data on the characters of *Listeria* strains / B.S. Ralovich, M. Shahamat, M. Woodbine // Med. Microbiol. Immunol. – 1977. – Vol. 163, № 2. – P. 125-139.

206. Rapose, A. *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient / A. Rapose, S.D. Lick, N. Ismail // Transpl. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 10, № 6. – P. 434-436. doi: 10.1111/j.1399- 3062.2008.00333.x
207. Rasmussen, O.F. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes / O.F. Rasmussen, P. Skouboe, L. Dons [et al.] // Microbiology. – 1995. – Vol.141, № Pt9. – P. 2053-2061. doi: 10.1099/13500872-141-9-2053
208. Reissbrodt, R. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.-an overview / R. Reissbrodt // Int. J. Food Microbiol. – 2004. – Vol. 95, № 1. – P. 1-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.025
209. Roberts, A. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III / A. Roberts, K. Nightingale, G. Jeffers [et al.] //Microbiology. – 2006. – № 152. – P. 685-693.
210. Rocourt, J. Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult / Rocourt J., Hof H., Schrettenbrunner A., Malinverni R., Bille J. // Schweiz Med Wochenschr. –1986. – Vol.116, № 8. – P. 248-251.
211. Salimnia, H. *Listeria grayi*: vancomycin-resistant, gram-positive rod causing bacteremia in a stem cell transplant recipient / H. Salimnia, D. Patel, P.R. Lephart [et al.] // Transpl. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 12, № 6. – P. 526-528. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00539.x
212. Schleifer, K.H. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications / K.H. Schleifer, O. Kandler // Bacteriol. Rev. – 1972. – № 36. – P. 407-477.
213. Schneebeli, R.A defined, glucose-limited mineral medium for the cultivation of *Listeria* spp / R. Schneebeli, T. Egli // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79, № 8. – P. 2503-2511.
214. Scobie, A. Mortality risk factors for listeriosis - a 10 year review of non-pregnancy associated cases in England 2006–2015 / A. Scobie, S. Kanagarajah, R.J. Harris [et al.] // J. Inf. – 2019. – № 78. – P. 208-214.

215. Seeliger, H.P.R. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. Methods in microbiology / H.P.R. Seeliger, K. Hohne. – London: Academic Press, 1979. – Vol. 13. – P. 31-49.
216. Severino, P. Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response / P. Severino, O. Dussurget, R.Z.N. Vêncio [et al.] // J. Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, № 19. – P. 6078-6088. doi.org/10.1128/AEM.02730-06
217. Sheehan, B. Microbiol infections process / Sheehan B., Kock S., Dransis [et al.] // Curr. Topics. Microbiol. Immunol. – 1994. – № 192. – P. 187-215.
218. Shetty, A. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital / A. Shetty, J. McLauchlin, K. Grant [et al.] // J. Hosp. Infect. – 2009. – Vol. 72, № 4. – P. 332-336. doi: 10.1016/j.jhin.2009.01.012
219. Siddiqi, R. Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes* / R. Siddiqi, M.A. Khan // Zentralbl. Bakteriell. – 1989. – Vol. 271, № 2. – P. 146-152. doi: 10.1016/s0934-8840(89)80067-2
220. Siddiqi, R. Vitamin and nitrogen base requirements for *Listeria monocytogenes* and haemolysin production / R. Siddiqi, M.A. Khan // Ibid. – 1982. – Vol. 253, № 2. – P. 225-235.
221. Smith, A.M. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017-2018: Laboratory Activities and Experiences Associated with Whole-Genome Sequencing Analysis of Isolates / A.M. Smith, N.P. Tau, S.L. Smouse [et al.] // Foodborne Pathog Dis. – 2019. – Vol. 16, № 7. – P. 524-530. doi: 10.1089/fpd.2018.2586
222. Staub, A.M. Etudes chimique et biochimique de la specificite immunologique des polysides bacteriens / A.M. Staub, O. Westphal // Bull. Soc. chim. boil. – 1964. – № 12. – P. 1647-1684.
223. Sue, D. SigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal envi-

- ronment / D. Sue, D. Fink, M. Wiedmann [et al.] // Microbiology. – 2004. – Vol. 150. – P. 3843-3855.
224. Swaminathan, B. The epidemiology of human listeriosis / B. Swaminathan, P. Gerner-Smidt // Microbes Infect. – 2007. – Vol. 9, № 10. – P. 1236-1243. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
225. Tsai, H.N. Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes* / H.N. Tsai, D.A. Hodgson // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, № 11. – P. 6943-6945.
226. Ueda, F. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats / F. Ueda, R. Anahara, F. Yamada [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2005. – № 105. – P. 455-462. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.022
227. Vazquez-Boland, J.A. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants / J.A. Vazquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche [et al.] // Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 14, № 3. – P. 584-640.
228. Verheul, A. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A / A. Verheul, N.J. Russell, R. Van'T Hof [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63, № 9. – P. 3451-3457. doi: 10.1128/AEM.63.9.3451-3457.1997
229. Vissing, N.H. *Listeria* meningitis in danish children 2000-2017: a rare Event even in a country with high rates of invasive listeriosis/ N.H. Vissing, K. Kristensen, M.B. Mønster [et al.] // Pediatr infect dis J. – 2019. – Vol. 38, № 10. – P. 274-276.
230. Walker, S.J. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures / S.J. Walker, P. Archer, J. G Banks // J. Appl. Bacteriol. – 1990. – Vol. 68, № 2. – P. 157-162. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x
231. Wang, P. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates in import food products of China from 8 provinces between 2005 and 2007 / P. Wang, H. Yang, Y. Hu [et al.] // J. Food Sci. – 2012. – Vol. 77, № 4. – P. 212-216.

232. Wang, Y. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China / Y. Wang, A. Zhao, R. Zhu [et al.] // BMC Microbiol. – 2012. – № 12. – 119. doi: 10.1186/1471-2180-12-119.
233. Welshimer, H.J. Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes* / H.J. Welshimer // J. Bacteriol. – 1963. – № 85. – P. 1156-1159.
234. Wemekamp-Kamphuis, H.H. Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures / Wemekamp-Kamphuis H.H., Sleator R.D., Wouters J.A. // J. Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – № 70. – P. 2912-2918.
235. Wu, S. *Listeria monocytogenes* prevalence and characteristics in retail raw foods in China / S. Wu, Q. Wu, J. Zhang, M. Chen, Z.A. Yan, H. Hu // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 8. – P. e0136682. doi.org/10.1371/journal.pone.0136682
236. Zaika, L.L. Growth kinetics and cell morphology of *Listeria monocytogenes* A. Scott as affected by temperature, NaCl and EDTA / L.L. Zaika, J.S. Faneli // J. Food Prot. – 2003. – Vol. 66, № 7. – P.1208-1215.
237. Zhao, T. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms / T. Zhao, M.P. Doyle, P. Zhao // J. Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – № 70. – P. 3996-4003.

21.20.23.110

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ «Иркутский
научно-исследовательский
противочумный институт
Сибири и Дальнего Востока»

Роспотребнадзора

Балахонов С.В.

2018 г.



Нормативный документ

**«СЫВОРОТКА ЛИСТЕРИОЗНАЯ АГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ
СУХАЯ ДЛЯ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ
(СЫВОРОТКА ЛИСТЕРИОЗНАЯ)»**

Технические условия

ТУ 21.20.23-015-01898090-2018

Введен впервые

Срок действия

с201... г.

до.....201....г.

2018 г.

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И ВЗАИМОПОМОЩИ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ
«ИРКУТСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ОЗНАМЕНА»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ СИБИРИ И
ДАЛЬНОГО ВОСТОКА»



Дата подп.
Исполн. и дата

Форма 4

Конфиденциальность гарантируется
получателем информации
Для служебного пользования. Экз. № _____

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ "Иркутский
научно-исследовательский противочумный
институт Сибири и Дальнего Востока"
Роспотребнадзора



С.В. Балахонов
«25» мая 2017 г.

ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ**на производство**

**СЫВОРОТКИ ЛИСТЕРИОЗНОЙ АГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ
СУХОЙ ДЛЯ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)**

ПР 01898090-015-17

Срок введения

с "25" мая 2017 г.



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора
И.М. Козлов



ПРОТОКОЛ ТЕХНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ № П-15-230 от 30.06.2017
медицинского изделия для диагностики *in vitro*
(Приложение В к Акту № П-15-230)

Наименование, адрес, телефон, факс, сайт, E-mail, испытательного центра:	Испытательный центр ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 115478, г.Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 16, тел./факс +7(495) 645-38-32, +7(495) 645-24-69, www.vniimt.org, E-mail: info@vniimt.org
Аккредитация Росаккредитации	№ RA RU.21IM59 от 02.06.2015
Наименование, адрес, телефон, факс, сайт, E-mail организации-заявителя:	ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора Адрес: 6664047, г. Иркутск, ул.Трилисера, д. 78 Тел.: (3952) 22 01 35. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru
Наименование, адрес, телефон, факс, сайт, E-mail организации-изготовителя:	ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора Адрес: 6664047, г. Иркутск, ул.Трилисера, д. 78 Тел.: (3952) 22 01 35. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru
Наименование изделия:	Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (РА) по ТУ 21.20.21-015-01898090-2017
Тип /модель изделия:	Сыворотки, антитела и прочие диагностические препараты, применяемые в медицине
Дата приема образцов:	15.05.2017
Сроки испытаний:	15.05.2017 – 30.06.2017
Вид испытаний:	Технические испытания
Проверка на соответствие требованиям:	ГОСТ Р 51088–2013, ГОСТ Р 51352–2013, ГОСТ Р ИСО 15223-1–2014, ТУ 21.20.21-015-01898090-2017
Результат проверки:	Медицинское изделие соответствует требованиям вышеперечисленных нормативных документов в части проверенных характеристик (см. Заключение)

Протокол не может быть частично или полностью перепечатан, или размножен без разрешения ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора. Любое использование названия ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора или его маркировочных знаков для рекламы проверенных медицинских изделий или их Изготовителя должно быть согласовано в письменной форме. Результаты проверки, приведенные в протоколе, действительны только для отобранных на испытания образцов медицинских изделий и не распространяются на всю продукцию в целом.



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ
 ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 16, Тел/факс: +7 (495) 645-38-32, E-mail: info@vniimt.org



оценки результатов технических испытаний медицинского изделия

№ П-15-230 от 30.06.2017

«Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (РА)
 по ТУ 21.20.21-015-01898090-2017» (см. Приложение А)

наименование медицинского изделия

Составлен в ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора

наименование организации, проводящей испытания с указанием места проведения испытаний

115478 г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 16

Полномочия на проведение испытаний, аккредитация на техническую компетентность и
 независимость для проведения работ по испытаниям.

Аттестат аккредитации испытательной организации

№ RA RU. 21IM59 от 22.06.2015

номер, дата выдачи

область аккредитации

с 15.05.2017 по 30.06.2017 г.

в ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора

наименование испытательной организации

проведена оценка результатов технических испытаний в форме проведения испытаний и оценки и
 анализа данных медицинского изделия «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая
 для реакции агглютинации (РА) по ТУ 21.20.21-015-01898090-2017» (см. Приложение Б)

наименование медицинского изделия (с указанием принадлежностей, необходимых для применения медицинского изделия по назначению)

производства ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири
 и Дальнего Востока» Роспотребнадзора; Адрес: 6664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, д. 78

наименование производителя, адрес, страна производства

в соответствии ТУ 21.20.21-015-01898090-2017

наименование и обозначение технической документации

на соответствие требованиям ГОСТ Р 51088-2013, ГОСТ Р 51352-2013, ГОСТ Р ИСО 15223-1-
 2014, ТУ 21.20.21-015-01898090-2017.

наименование и обозначение нормативной и технической документации

Акт не может быть частично или полностью перепечатан или размещен без разрешения ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора. Любое
 использование названий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора или его маркировочных знаков для рекламы проверенных медицинских
 изделий или их Изготовителя должно быть согласовано в письменной форме. Результаты проверки, приведенные в акте, действительны
 только для отобранных на испытания образцов медицинских изделий и не распространяются на всю продукцию в целом.



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)**

п. Оболенск, Серпуховский район, Московская
область, 142279

тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

e-mail: info@obolensk.org, <http://www.obolensk.org>

ОКПО 78095326 ОГРН 1055011113772 ИНН 5077018190
КПП 507701001

Утверждаю
Директор ФБУН ГНЦ ПМБ
Роспотребнадзора
Академик РАН, проф.
Дятлов И.А.



Протокол от 29.03.2019 г.

межлабораторных испытаний сыворотки листериозной агглютинирующей сухой для
реакции агглютинации

Нами, комиссией в составе : старшего научного сотрудника лаборатории антимикробных ФБУН ГНЦ ПМБ, к.м.н. Карцева Н.Н., старшего научного сотрудника лаборатории антимикробных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ, к.б.н. Борзенкова В.Н., младшего научного сотрудника научно-производственного отдела ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Хаптановой Н.М, ведущего научного сотрудника лаборатории антимикробных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ, к.б.н. Фурсовой Н.К. проведены испытания экспериментальной сыворотки листериозной агглютинирующей сухой для реакции агглютинации, производства ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора (серия № 44, 2018 г.).

Контроль специфической активности и специфичности сыворотки проводился в реакции агглютинации на стекле (см. п.5.7-п.п. 5.7.1,5.7.2 ,5.7.3, 5.8), а также в пробирочной реакции агглютинации (см. п.5.7-п.п. 5.7.4, 5.7.5) согласно ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 “Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации”.

Исследования проводились на штаммах из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур “ГКПМ - “ОБОЛЕНСК”.

В работе использовали 28 штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных из

Продолжение приложения 5

различных источников и регионов, а также 16 штаммов *Listeria ssp.*: *L. welschimerii*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. grayi (subs murray)*.

Результаты исследований представлены в таблицах 1-2.

Таблица №1 Специфическая активность листериозной агглютинирующей сыворотки в реакциях агглютинации на стекле и в пробирках со штаммами *Listeria monocytogenes*

№ п/п	Вид микроорганизмов	Название штамма	№ в коллекции ГКПМ	Регион выделения	Источник выделения	Результат реакции агглютинации на стекле	Титр сыв-ки в пробирочной реакции агглютинации
1	<i>L. monocytogenes</i>	BB-1	В 7495	Ярославль	Больной менингит	++++	1/800 ++++
2	<i>L. monocytogenes</i>	MIB-871	В 7909	Москва	Больной менингит	+++	1/800 ++++
3	<i>L. monocytogenes</i>	TVe № 1895	В 8359	Тверь	Мясо говядина	+++	1/800 ++++
4	<i>L. monocytogenes</i>	TVe № 2269	В 8360	Тверь	Рыба форель	++++	1/800 ++++
5	<i>L. monocytogenes</i>	OR-513	В8702	Орел	Больной менингит	++++	1/800 ++++
6	<i>L. monocytogenes</i>	OR-517	В 8701	Орел	Больной менингит	++++	1/800 ++++
7	<i>L. monocytogenes</i>	Bel-1	В 8700	Белгород	Больной менингит	++++	1/800 ++++
8	<i>L. monocytogenes</i>	MO-um	В 8699	Московская область	Больной менингит	+++	1/800 ++++
9	<i>L. monocytogenes</i>	MO-Ob	В 8698	Московская область	Больной ангиной	++++	1/800 ++++
10	<i>L. monocytogenes</i>	ROS 150-1	В 8697	Ростов-на-Дону	Мясо рубленое	++++	1/800 ++++
11	<i>L. monocytogenes</i>	V12	В 8696	Вологда	Мясо птицы	++++	1/800 ++++
12	<i>L. monocytogenes</i>	V23	В 8695	Вологда	Охлажденная говядина	++++	1/800 ++++
13	<i>L. monocytogenes</i>	V30	В 8694	Вологда	Мясо	++++	1/800 ++++
14	<i>L. monocytogenes</i>	V40	В 8693	Вологда	Мясо птицы	++++	1/800 ++++
15	<i>L. monocytogenes</i>	V41	В 8692	Вологда	Филе рыбы	++++	1/800 ++++
16	<i>L. monocytogenes</i>	V44	В 8691	Вологда	Котлета	++++	1/800 ++++
17	<i>L. monocytogenes</i>	V59	В 8690	Вологда	Охлажденная говядина	++++	1/800 ++++
18	<i>L. monocytogenes</i>	V276-2	В 8689	Вологда	Больной (сепсис)	++++	1/800 ++++
19	<i>L. monocytogenes</i>	V299-1	В 8688	Вологда	Околоплодные воды	++++	1/800 ++++
20	<i>L. monocytogenes</i>	Water3	В 8687	Вологда	Сточные воды	++++	1/800 ++++
21	<i>L. monocytogenes</i>	Water4	В 8686	Вологда	Сточные воды	++++	1/800 ++++
22	<i>L. monocytogenes</i>	Water5	В 8685	Вологда	Сточные воды	++++	1/800 ++++
23	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC13932	В-7272	Музейный штамм		++++	1/800 ++++
24	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC10357	В-7271	Музейный штамм		++++	1/800 ++++
25	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC11994	В-4810	Музейный штамм		++++	1/800 ++++
26	<i>L. monocytogenes</i>	766/1	В-4908	Музейный штамм		++++	1/800 ++++

Продолжение приложения 5

27	<i>L. monocytogenes</i>	766/mxr	B-4909	Музейный штамм		++++	1/800 ++++
28	<i>L. monocytogenes</i>	766/П	B-4910	Музейный штамм		++++	1/800 ++++

Примечание: ++++ - реакция агглютинации на четыре креста, +++ - на три креста, 1/800 - титр сыворотки в пробирочной реакции.

Как следует из данных таблицы 1, испытуемая сыворотка характеризуется наличием положительной реакции агглютинации на стекле со всеми 28 исследованными штаммами:

в 25 случаях (89,3%) реакция оценивалась на четыре креста (++++),

в 3 случаях (10,7%) реакция оценивалась на три креста (+++).

Сыворотка характеризуется наличием положительной пробирочной реакцией агглютинации на четыре креста (++++) со всеми штаммами *Listeria monocytogenes* в титре 1/800.

Таблица №2 Специфичность листериозной агглютинирующей сыворотки в реакции агглютинации на стекле со штаммами *Listeria ssp.*

№ п/п	Вид микроорганизмов	Название штамма	№ в коллекции ГКПМ	Результат реакции агглютинации
1	<i>L. welshimerii</i>	B-107	B-8157	-
2	<i>L. welshimerii</i>	4911	B-4911	-
3	<i>L. welshimerii</i>	Ярославль3	B-7499	-
4	<i>L. innocua</i>	ATCC33090	B-7274	-
5	<i>L. innocua</i>	B-64	B-8155	-
6	<i>L. innocua</i>	M4	B-6643	-
7	<i>L. ivanovii</i>	ATCC19119	B-7381	-
8	<i>L. ivanovii</i>	7842	B-7759	-
9	<i>L. ivanovii</i>	11840	B-4912	-
10	<i>L. seeligeri</i>	ATCC35967	B-7767	-
11	<i>L. seeligeri</i>	SLSC5981	B-7385	-
12	<i>L. seeligeri</i>	LSC3954	B-7386	-
13	<i>L. grayi</i>	ATCC25400	B-7768	-
14	<i>L. grayi</i>	MKM2	B-7384	-
15	<i>L. grayi</i>	ИП	-	-
16	<i>L. murrayi</i>	G-44	-	-
17	<i>Sh. flexneri</i>	170	-	-
18	<i>E. coli</i>	ATCC25952	-	-
19	<i>Y. enterocolitica</i> O3	628/1	-	-
20	<i>S. typhimurium</i>	21	-	-
21	<i>S. enteritidis</i>	Gartneri	-	-
22	<i>S. aureus</i>	6538	-	-

Как следует из данных таблицы 2, испытуемая сыворотка характеризуется: наличием отрицательной реакции со всеми 16 исследованными штаммами *Listeria ssp.*, а так же культурами *Sh. flexneri*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. aureus*.

Таким образом, сыворотка характеризуется 100 % специфичностью для *Listeria monocytogenes*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Межлабораторные испытания показали:

- сыворотка характеризуется 100 % специфичностью для *Listeria monocytogenes*,
- сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (серия № 44, 2018 г.) по специфической активности сыворотка соответствует требованиям ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 "Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации" и может быть использована в практической микробиологической медицинской и ветеринарной работе.

Исполнители:

Старший научный сотрудник лаборатории
антимикробных препаратов ФБУН ГНЦПМБ, к.м.н.

 / Карцев Н.Н./

Старший научный сотрудник лаборатории
антимикробных препаратов ФБУН ГНЦПМБ, к.б.н.,

 / Борзенков В.Н./

Ведущий научный сотрудник лаборатории
антимикробных препаратов ФБУН ГНЦПМБ, к.б.н.,

 / Фурсова Н.К./

Младший научный сотрудник научно-производственного
отдела ФКУЗ Иркутский НИПЧИ,

 / Хаптанова Н.М./



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)**

п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, 142279
тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10
e-mail: info@obolensk.org, <http://www.obolensk.org>
ОКПО 78095326 ОГРН 1055011113772 ИНН 5077018190 КПП 507701001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН ГНЦ ПМБ
академик РАН, д.м.н. проф.

Дятлов Иван Алексеевич



2019г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в научно-исследовательскую работу Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии результатов научных исследований, полученных в ходе выполнения диссертационной работы Хаптановой Натальи Маркеловны на тему: «Совершенствование технологии получения сыворотки листериозной агглютинирующей сухой для реакции агглютинации».

Наименование предложения для внедрения: идентификация штаммов *Listeria monocytogenes* с помощью экспериментальной сыворотки листериозной сухой для РА, производства ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора.

Кем предложен, адрес исполнителя: младшим научным сотрудником научно-производственного отдела, отдел биологического и технологического контроля Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Хаптановой Натальей Маркеловной, г. Иркутск.

Где и когда внедрено: в лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии, Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск Московской области, 2019 г.

Продолжение приложения 6

Эффективность внедрения: экспериментальная сыворотка листериозная сухая для РА используется для идентификации штаммов *Listeria monocytogenes* в работе Референс-центра по листериозам, а также в рамках выполнения НИР 049 Роспотребнадзора.

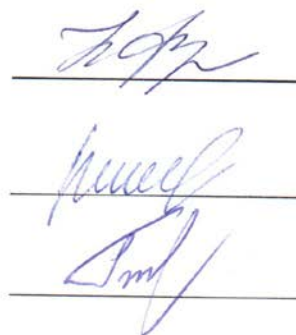
Замечания, предложения: считаем целесообразным применение сыворотки листериозной сухой для РА, производства ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора для идентификации штаммов *Listeria monocytogenes*.

Ответственные за внедрение:

В.н.с. лаборатории антимикробных
препаратов ОММ, к.б.н. Фурсова Н.К.

С.н.с. лаборатории антимикробных
препаратов ОММ, к.м.н. Карцев Н.Н.

С.н.с. лаборатории антимикробных
препаратов ОММ, к.б.н. Борзенков В.Н.



«Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора)
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, тел (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ «Российский научно-
исследовательский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора
академик РАН д.м.н., профессор

Кутырев В.В.

2021 г.



М.П.

Протокол
№ 31 от «17» сентября 2021 г.

клинических испытаний МИ для диагностики *in vitro*
«Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации
(Сыворотка листериозная)» по ТУ 21.20.23-015-01898090-2018

1. Условия и место проведения испытаний: клинические испытания проведены сотрудниками Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека согласно эксплуатационной документации разработчика, на основании Разрешения на проведение клинических испытаний медицинского изделия (МИ) Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения № 777/2018 от 01 октября 2018 г. на базе отдела диагностики инфекционных болезней Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора включен Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения в перечень организаций, проводящих испытания медицинских изделий для государственной регистрации № приказа 1476 от 12 марта 2014 г., имеет Лицензию на медицинскую деятельность № ФС-64-01-001706 от 05 марта 2015 г.; Лицензию на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных заболеваний (выполнение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности) № 77.99.18.001.Л.000066.06.08 от 03.06.08 г.

Сроки проведения испытаний: 28.10.19 – 01.03.20 г., 10.09.21 – 17.09.21 г.

2. Цель испытаний: проверка функциональных свойств, эффективности, качества и безопасности медицинского изделия для *in vitro* диагностики «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (Сыворотка листериозная)» по ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 при использовании в соответствии с назначением, предусмотренным производителем, а именно, для идентификации листериозного микроба в реакции агглютинации на стекле и пробирочной реакции агглютинации, а также оценка возможности применения в медицинской лабораторной практике на территории Российской Федерации.

Протокол клинических испытаний МИ «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (Сыворотка листериозная)» по ТУ 21.20.23-015-01898090-2018

№ 31 от 17 сентября 2021 г. Страница 1 из 124

«Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
 Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
 человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора)
 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, тел (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ «Российский научно-
 исследовательский противочумный
 институт «Микроб» Роспотребнадзора
 академик РАН _____ д.м.н., профессор

Кутырев В.В.

_____ 2021 г.



АКТ

оценки результатов клинических испытаний
 медицинского изделия для диагностики *in vitro*
 № 31 от «17» сентября 2021 г.

1. «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации
 (Сыворотка листериозная)» по ТУ 21.20.23-015-01898090-2018

Составлен Федеральным казенным учреждением здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46.

Место проведения испытаний:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора). Лицензия на медицинскую деятельность № ФС-64-01-001706 от 05 марта 2015 г.; лицензия на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных заболеваний (выполнение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности) № 77.99.18.001.Л.000066.06.08 от 03.06.08 г., включен Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения в перечень организаций, проводящих испытания медицинских изделий для государственной регистрации № приказа 1476 от 12 марта 2014 г.

В периоды с 28.10.19 г. по 01.03.20 г. и с 10.09.2021 – 17.09.21 г. сотрудниками отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора была проведена оценка результатов клинических испытаний медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (Сыворотка листериозная)» по ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 (в составе: 10 ампул лиофилизированной сыворотки, инструкция по применению, паспорт и нож ампульный) производства Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав

Акт оценки результатов клинических испытаний «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (Сыворотка листериозная)» по ТУ 21.20.23-015-01898090-2018

№ 31 от 17 сентября 2021 г. Страница 1 из 11

Форма 4

Конфиденциальность гарантируется получа-
телем информации

Для служебного пользования. Экз. № ____

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**УТВЕРЖДАЮ**Директор ФКУЗ "Иркутский
научно-исследовательский противочумный
институт" Роспотребнадзора

С.В. Балахонов

« 14 » 11 2019 г.

**ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ**

на производство

ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИСТЕРИЙ СУХОЙ

ПР № 01898090-020-19

Срок введения

с " 14 " 11 20 19 г.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**RU2020621065**

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ
АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ**

Номер регистрации (свидетельства):
2020621065
Дата регистрации: 25.06.2020
Номер и дата поступления заявки:
2020620898 09.06.2020
Дата публикации и номер бюллетеня:
25.06.2020 Бюл. № 7
Контактные реквизиты:
Тел. (3952) 22-13-12, E-mail:
adm@chumin.irkutsk.ru

Автор(ы):
Хапганова Наталья Маркеловна (RU),
Кузнецов Владимир Ильич (RU),
Ивашкова Ольга Николаевна (RU),
Гефан Наталья Геннадьевна (RU),
Остяк Александр Сергеевич (RU),
Лукьянова Светлана Владимировна (RU),
Балахонов Сергей Владимирович (RU)
Правообладатель(и):
Федеральное казённое 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 (RU)

Название базы данных:
**ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И
ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИСТЕРИЙ**

Реферат:

База данных (БД) содержит информацию о питательных средах, предназначенных для культивирования, выделения и идентификации листерий. В БД внесены данные по наименованию, производителю, назначению сред, компонентному составу, селективным добавкам и питательным основам. БД может быть использована научными сотрудниками, специалистами Роспотребнадзора для научно-исследовательских и микробиологических исследований.

Вид и версия системы управления базой данных: Access

Объем базы данных: 1,71 Мб

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19)

RU

(11)

2 767 782

(13)

C1

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(52) СПК

C12N 1/20 (2021.08)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 21.03.2022)

(21)(22) Заявка: 2021116115, 02.06.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия
патента:
02.06.2021

Дата регистрации:
21.03.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.06.2021

(45) Опубликовано: 21.03.2022 Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в
отчете о поиске: RU 2525637 C2,
20.08.2014. RU 2366702 C2, 10.09.2009.
КОВТУН Ю.С. и др. Сравнительная
оценка потенциальных белковых
основ микробиологических сред,
Проблемы особо опасных инфекций,
вып. 3, 2014, с.92-95. SIMMLER C.,
Universal quantitative NMR analysis of
complex natural samples, Cur.Opin.
Biotechnol, 2014, 25:51-9,

<https://doi.org/10.1016/j.cophio.2013.08.004>.

Адрес для переписки:

664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера,
78, ФКУЗ Иркутский научно-
исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора

(72) Автор(ы):

Кузнецов Владимир
Ильич (RU),
Хаптанова Наталья
Маркеловна (RU),
Гефан Наталья
Геннадьевна (RU),
Ивашкова Ольга
Николаевна (RU),
Остяк Александр
Сергеевич (RU),
Кошилко Варвара
Сергеевна (RU),
Балахонов Сергей
Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное
казённое 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 (RU)

(54) Питательная среда для получения биомассы листерий

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской биотехнологии и может быть использовано для получения биомассы листерий. Питательная среда содержит гидролизат речной рыбы, панкреатический, гидролизат отходов производства мясной воды, панкреатический, ферментированный яичный желток, хлорид натрия, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный, витамин В₁, глюкозу, агар микробиологический и дистиллированную воду при предлагаемом соотношении компонентов. Предлагаемая среда позволяет получать биомассу листерий с сохранением S-формы выращиваемой культуры в количестве, достаточном для приготовления антигена, предназначенного для иммунизации животных-продуцентов при производстве листериозной агглютинирующей сыворотки. 1 табл.