

день, семь дней подряд. Наибольший терапевтический эффект даёт комплексное применение антибиотиков с сульфаниламидными препаратами.

Для снижения угнетающего действия антибиотиков и сульфаниламидов на иммунитет животных их применение комбинировали с кортикостероидным препаратом – преднизолоном, кроме того, последний эффективно снимал воспалительные явления. Назначали преднизолон внутримышечно в дозе 1 мл на инъекцию, один раз в сутки в течение семи дней. Из симптоматических средств следует использовать отхаркивающие и противокашлевые препараты. В течение пяти – семи дней подряд, два – три раза в сутки применяют с жидкими тёплыми кормами (из расчёта на 1 кг массы тела) следующие препараты: терпингидрат – 0,01-0,03 г, натрия гидрокарбонат – 0,1-0,2, термописис с тёплым молоком, настой ипекакуаны, пектусин и др. Значительным действием обладают аэрозольные ингаляции тёплого водяного пара с натрия гидрокарбонатом, ментолом, настоем эвкалипта и другие по 5-10 минут, три–четыре раза в сутки, в течение пяти–семи дней. При сильном кашле следует вводить кодеин или дионин в дозе 0,001 – 0,0075 г на приём однократно, либексин по одной таблетке три раза в день.

Вопросы прижизненной серологической диагностики и специфической профилактики данного заболевания не разработаны.

УДК 619.616.9

ПЕРСПЕКТИВЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО СОЗДАНИЮ СОВРЕМЕННЫХ СРЕДСТВ, МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ЛИСТЕРИОЗА

Д.А. Васильев, УГСХА, В.Г. Лунин, В.А. Луговцев, ВНИИСХБ

На сегодняшний день листериоз представляет собой значительную проблему не только как классическая нозологическая единица заболевания с-х. животных, но и как пищевая инфекция. Листериозу подвержены 104 вида животных и рыб, в том числе сельскохозяйственные животные, а также человек. Вспышки листериоза среди сельскохозяйственных животных сопровождаются значительными экономическими потерями,

связанными с падежом, лечением больных животных, ограничениями в реализации продуктов животноводства, полученных от больных животных, противозэпизоотическими и противозэпидемическими мероприятиями. Контаминация патогенными листериями продуктов питания (мясных, молочных, рыбных продуктов, а также овощей) обуславливает возникновение вспышек пищевой инфекции, сопровождающихся тяжелыми последствиями, зачастую с фатальным исходом у людей с первой группы риска.

Стационарность и широкое распространение возбудителя листериоза *Listeria monocytogenes* обусловлены двумя основными факторами:

1-сапрозной природой листерий, у которых естественным резервуаром в природе являются грызуны (в т.ч. синантропные) и почва;

2- способность активно существовать и размножаться не только при температуре тела животного и человека, но и при пониженных температурах (4-20°C) в режимах хранения продуктов питания, в условиях холодильников.

Основными средствами диагностики листериоза в России остаются микробиологические методы, требующие значительных трудовых и временных затрат (выделение культуры возбудителя на селективных средах, биохимическая идентификация и т.п.), достаточно дорогостоящи, малопроизводительны. Поэтому остро встает задача создания современных экспрессных высокочувствительных и специфичных средств и методов диагностики листериоза.

Одним из путей преодоления указанных недостатков является разработка и использование систем на основе методов выявления генома возбудителя с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный подход позволит проводить прижизненную экспресс-диагностику, а также идентифицировать присутствие возбудителя листериоза в продуктах питания. Для детекции специфических антител наиболее широкое распространение приобрели методы на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА). Преимуществами данной технологии являются экспрессность, стандартизованность компонентов реакции, высокая производительность, что позволяет

использовать ее для широких скрининговых исследований.

При создании вакцин против листериоза необходимо учитывать следующие особенности биологии данного микроорганизма. Возбудитель листериоза отличается от других патогенных микроорганизмов – облигатных внутриклеточных паразитов тем, что обладает системой порообразования в мембране фагосомальной вакуоли макрофага (первичного очага внутриклеточной локализации) и соответственно способностью выходить в цитозоль клетки, где и происходит его дальнейшее размножение. Это в свою очередь предопределяет трудности презентации бактериальных антигенов антиген-презентирующими клетками и неэффективный иммунный ответ.

В природных очагах листериоза (а он распространен практически повсеместно) необходима постоянная иммунизация овец, крупного рогатого скота, свиней. Вакцинация может быть показана и для людей, входящих в группы риска. Необходимо отметить, что при данных объемах вакцинации разработка новых улучшенных вариантов вакцин является очень перспективной.

Существующие на сегодняшний день живые вакцины, основанные на использовании аттенуированных штаммов (АУФ, УСХИ –19, УСХИ-52), обладают недостаточной протективной активностью, небольшой продолжительностью иммунитета и возможной реверсией, что нередко вызывает осложнения, особенно у животных с пониженной резистентностью организма (на фоне иммуносупрессии). Все это требует новых подходов в создании против листериоза эффективных вакцин нового поколения. Одним из таких направлений является создание рекомбинантной субъединичной вакцины, лишенной всех выше перечисленных недостатков.

Задачами исследований в указанных областях НИР являются следующие:

1. Клонировать гены, кодирующие основные белки *L. monocytogenes*, являющиеся основными мишенями эффекторных систем иммунной системы организма при листериозе (LLO), а также гены, кодирующие основные белки *L. monocytogenes*, участвующие в формировании иммунного ответа против листериоза (ген *hly*, *p60*).

2. Создать системы на основе *E. coli*, обеспечивающие по-

лучение рекомбинантных белков с заданными свойствами.

3. Создать систему экспрессии химерных белков, включающих домены листериозных белков, имеющих антигенные детерминанты и домен связывания с целлюлозой.

4. Изучить антигенные и иммуногенные свойства химерных белков, а также в ассоциации с различными адьювантами и иммуномодуляторами.

5. Отработать протокол постановки ТФ ИФА с использованием химерных белков для выявления антител к LLO.

6. Провести сиквенс эталонных штаммов листерий разных видов и определить специфические участки генома, пригодные для генодиагностики.

7. Подобрать специфические праймеры, позволяющие идентифицировать *L.monocytogenes*.

8. Отработать методику пробоподготовки в зависимости от вида образца (кровь, биопат, продукты питания и т.п.).

9. Отработать условия проведения и формат ПЦР для идентификации специфических участков генома *L.monocytogenes*.

10. Создать иммуногенную композицию на основе химерных белков и системы адьювант-иммуномодулятор (+носитель), пригодную для использования в качестве вакцинного препарата против листериоза.

11. Изучить протективную активность иммуногенной композиции на лабораторных (с-х) животных.

12. Провести комиссионные испытания наборов препаратов для выявления антител к *L.monocytogenes* с использованием ИФА и обнаружения генома *L.monocytogenes* с использованием ПЦР.

Решение указанных задач возможно при формировании этапов и планировании их целей. Примерная структура этапов показана в таблице.

Как и обычно, при проведении научно-исследовательских работ необходимо планировать ожидаемые результаты.

В результате выполнения задач и этапов указанной темы исследований ожидается создание современных диагностических тест-систем для идентификации специфических участков генома *Listeria monocytogenes* в пробах патологического материала и продуктах питания и выявления специфических антител

в пробах крови вакцинированных или переболевших животных (человека). Создаваемые тест-системы будут обладать рядом преимуществ по сравнению с уже имеющимися.

Примерная структура этапов при планировании темы НИР
по диагностике и профилактике листериоза

№	Наименование этапов	Основное содержание работ по этапу	Чем заканчивается этап
1	2	3	4
1	Создание тест-системы на основе ИФА для выявления антител к <i>L. monocytogenes</i>	Клонирование и очистка белков. Проверка основных свойств белков. Создание моделей ИФА с использованием полученных белков	Варианты ИФА для выявления антител к <i>L. monocytogenes</i>
1.1	Клонирование целлюлозосвязывающего домена	Подбор векторной системы, клонирование целлюлозосвязывающего домена. Проверка активности продукта экспрессии.	Получение системы (вектора), экспрессирующей целлюлозосвязывающий домен
1.2	Клонирование гена LLO (hly) <i>L. monocytogenes</i>	Клонирование гена LLO (hly) <i>L. monocytogenes</i> , проверка экспрессии и активности продукта при взаимодействии с антителами	Получение системы (вектора), экспрессирующей белок LLO <i>L. monocytogenes</i>
1.3	Создание экспрессионной системы целлюлозосвязывающий домен-LLO <i>L. monocytogenes</i>	Клонирование в одном векторе последовательно генов целлюлозосвязывающего домена и LLO <i>L. monocytogenes</i> с целью получения химерного белка, обладающего свойствами обеих составляющих	Получение системы (вектора), экспрессирующей химерный белок со свойствами целлюлозосвязывающего домена и LLO <i>L. monocytogenes</i>
1.4	Проверка антигенных свойств химерного белка целлюлозосвязывающий домен-LLO <i>L. monocytogenes</i>	Проверка антигенной активности домена LLO <i>L. monocytogenes</i>	Отбор систем, экспрессирующих химерный белок с заданными свойствами

Продолжение таблицы

1	2	3	4
2	Создание тест-систем для выявления антител к <i>L.monocytogenes</i> методом ИФА на основе рекомбинантных белков.	Получение специфических антител, отработка протоколов проведения реакции. Оценка чувствительности и специфичности.	Отработка протокола тест-систем.
2.1	Получение специфических антител на полученный рекомбинантный белок LLO <i>L.monocytogenes</i> (в составе химерного белка)	Иммунизация животных. Подбор оптимальной схемы иммунизации. Получение сыворотки крови и очистка антител. Проверка аффинности антител.	Отработка схемы иммунизации. Получение специфической сыворотки (антител).
2.2	Отработка протокола проведения ИФА	Отработка условий проведения ИФА. Определение аналитической чувствительности и специфичности методов	Отработанные протоколы ИФА для выявления антител к <i>L.monocytogenes</i>
2.3	Проверка тест-систем на полевых (клинических) образцах	Определение диагностической чувствительности и специфичности методов.	Определение диагностической ценности (пригодности) разработанных тест-систем
3	Создание рекомбинантной субъединичной вакцины против листериоза	Создание иммуногенных композиций, пригодных для использования в качестве вакцинных препаратов против листериоза	Субъединичная вакцина против листериоза
3.1	Клонирование целлюлозосвязывающего домена	Подбор векторной системы, клонирование целлюлозосвязывающего домена. Проверка активности продукта экспрессии.	Получение системы (вектора), экспрессирующей целлюлозосвязывающий домен
3.2	Клонирование гена LLO (hly) <i>L.monocytogenes</i>	Клонирование гена LLO (hly) <i>L.monocytogenes</i> , проверка экспрессии и активности продукта при взаимодействии с антителами	Получение системы (вектора), экспрессирующей белок LLO <i>L.monocytogenes</i>

Продолжение таблицы

1	2	3	4
3.3	Создание экспрессионной системы целлюлозосвязывающий домен- LLO L.monocytogenes	Клонирование в одном векторе последовательно генов целлюлозосвязывающего домена и LLO L.monocytogenes с целью получения химерного белка, обладающего свойствами обеих составляющих	Отработка протокола тест-ситстем.
3.4	Проверка антигенных и иммуногенных свойств химерного белка "целлюлозосвязывающий домен- LLO L.monocytogenes"	Проверка антигенной и иммуногенной активности домена LLO L.monocytogenes	Отбор систем, экспрессирующих химерный белок с заданными свойствами
3.5	Подбор оптимального соотношения антиген-адьювант-носитель и отработка схемы иммунизации. Создание вакцинной формы.	Проверка разных комплексов антиген +адьювант+носитель. Выбор оптимальных компонентов. Отработка схемы иммунизации.	Получение вакцинной формы. Отбор наиболее оптимальной иммуногенной композиции, пригодной для использования в качестве вакцины.
3.6	Проверка протективной активности вакцинной формы	Проверка протективной активности препаратов. Иммунизация животных. Контрольное заражение. Оценка протективности.	Оценка протективности вакцинного препарата.
3.7	Проведение комиссионной проверки диагностических наборов и вакцины	Комиссионная проверка диагностических наборов и вакцины	Комиссионная оценка диагностических наборов и вакцины
3.8	Подача документов для регистрации диагностических наборов вакцины (лицензирование)	Оформление документов для регистрации диагностических наборов и вакцины в Фармсовете	Сдача документов в Фармсовет
4	Оформление отчетов и публикаций по результатам темы	Оформление статей и отчетов	Подача статей в редакции журналов. Сдача отчетов по теме.
4.1	Оформление НТД регистра- ция (лицензирование)	Оформление НТД. Оформления заявки на патент.	НТД на диагностические наборы и вакцину. Заявка на патент

Тест-системы на основе ПЦР будут оптимизированы с использованием уникальных праймеров, специфичных определенным участкам генов, ответственных за вирулентность возбудителя, а также за счет применения высокотехнологичной системы проведения пробоподготовки и анализа.

Тест-системы на основе ТФ ИФА будут основаны на использовании рекомбинантных антигенов, полученных генноинженерными методами. Данная методология позволит нарабатывать специфический протеин (антиген) в необходимом количестве, проводить 100%-ную очистку интересующего протеина от сопутствующих белков и обеспечит высокую специфичность реакций и удешевление стоимости анализа. В состав антигена будут входить мультидоменный белок, включающий в себя в качестве обязательных компонентов целлюлозосвязывающий домен (обеспечивающий легкость очистки и иммобилизацию на носителе), один или несколько специфических белков (или их фрагментов), являющихся основными мишенями клеточного и гуморального иммунного ответа (LLO, р60), и соединяющий их линкер. Составные части мультидоменного белка можно будет модифицировать или заменять на другие в процессе подбора наиболее удачной композиции диагностического препарата.

Ожидается создание субъединичной рекомбинантной вакцины против листериоза, которая будет обладать одновременно несколькими преимуществами по сравнению с существующими. Во-первых, субъединичная вакцина более безопасна, так как содержит лишь одну или несколько молекул белка (несущего антигенные детерминанты, участвующие в формировании иммунного ответа) и не содержит собственно возбудителя инфекции, как живые вакцины. Во-вторых, она одновременно является рекомбинантной вакциной, т.е. белковые компоненты будут получены на основе генно-инженерной технологии.

Основой вакцины будет мультидоменный белок, включающий в себя в качестве обязательных компонентов целлюлозосвязывающий домен (обеспечивающий легкость очистки и иммобилизацию на носителе), один или несколько белков (или их фрагментов), являющихся основными мишенями клеточного и гуморального иммунного ответа (LLO, iap, Igra), и соединяющий их линкер. Составные части мультидоменного белка можно

будет модифицировать или заменять на другие в процессе подбора наиболее удачной композиции вакцины. В-третьих, данная вакцина будет лишена балластных компонентов, поскольку схема наработки и очистки рекомбинантного белка предусматривает 100% очистку за счет присутствия в составе рекомбинантного белка целлюлозосвязывающего домена. В-четвертых, достоинство заключается в применении новой адъювантной технологии и иммуномодуляции. Повышение иммуногенности достигается за счет укрупнения, полимеризации молекул антигена на целлюлозном/хитин-содержащем сорбенте (различных формах природной и модифицированной целлюлозы и хитозана), повышающем иммуногенность белковых антигенов в десятки и сотни раз.

Одновременно с ожидаемыми результатами необходимо планировать ожидаемый формат продуктов. В данной области исследования ими являются следующие продукты.

Набор препаратов для выявления генома *Listeria monocytogenes* с помощью ПЦР.

Набор препаратов для выявления антител специфичных *Listeria monocytogenes* с помощью ТФ ИФА.

Экспериментальные серии субъединичной рекомбинантной вакцины против листериоза.

Форма защиты полученной интеллектуальной собственности включает следующие положения.

Оформляются заявки на патенты:

- по методу разработки и созданию современных диагностических систем для идентификации возбудителя листериоза (*Listeria monocytogenes*) и выявления специфических антител в крови животных и человека;

- по технологии создания субъединичной рекомбинантной вакцины против листериоза.

При получении положительных планируемых результатов будут проведены следующие производственные испытания и внедрение.

Разработанные диагностические и вакцинные препараты будут испытаны на лабораторных и с-х. животных.

В случае положительных результатов будет подготовлена НТД на их опытно-промышленное изготовление.