DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-07.33>

**РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДБОРА НОВОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ
MANNHEIMIA HAEMOLYTICA «КЛ – ВИЭВ» ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СРЕДСТВ
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ МАНХЕЙМИОЗА КРУПНОГО И МЕЛКОГО
РОГАТОГО СКОТА**

**THE RESULTS OF THE SELECTION OF MANNHEIMIA HAEMOLYTICA'S
NEW STRAIN "KL-VIEV" FOR THE PRODUCTION OF SPECIFIC PREVENTION AGENTS
FOR MANHEIMIA OF LARGE AND SMALL CATTLE**

Лаишевцев А.И., старший научный сотрудник
Laishevtcev A.I., Senior Researcher

**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Москва, Россия**

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine

named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

E-mail: a-laishevtsev@bk.ru

АННОТАЦИЯ

В работе представлены результаты изучения свойств изолятов бактерий *Mannheimia haemolytica*, выделенных в 2015-2017 годах от крупного и мелкого рогатого скота в различных регионах Российской Федерации по показателям серотиповая принадлежность, патогенность, вирулентность и антигенная активность. В ходе выполнения работы установлено, что из 5 полученных культур *M. haemolytica*, а именно «КЛ-ВИЭВ», «АМ9», №207, №217 и №219, для производства биопрепаратов могут быть использованы две, поскольку подходят под установленные критерии: «КЛ-ВИЭВ» и №217, так как относятся к серотипу А1 и вирулентны для белых мышей. Для использования в качестве производственного при разработке и изготовления биопрепаратов был отобран штамм *M. haemolytica* «КЛ-ВИЭВ».

ABSTRACT

Paper presents the results of studying the properties of *Mannheimia haemolytica* isolates found in various regions of the Russian Federation during 2015-2017 in terms of serotypic affinity, pathogenicity, virulence and antigenic activity. It was established that two of the five *M. haemolytica* strains, namely «KL-VIEV», «AM9», №207, №217 and №219, can be used for biopreparation production, since they are suitable for following criteria: «CL-VIEV» and №217 belong to the serotype A1 and virulent for white mice. Based on the obtained data, «KL-VIEV» was selected for industrial usage in the development and manufacture of biopreparations.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Биопроизводство, вакцинопрофилактика, пастереллёз, эпизоотический мониторинг, отечественные вакцины, специфическая профилактика, антигенные свойства, методы контроля.

KEY WORDS

Bioproduction, vaccine, pasteurellosis, epizootic monitoring, domestic vaccine specific prevention, antigenic properties, methods of control.

Биопроизводство является неотъемлемой частью системы обеспечения эпизоотического благополучия страны, на основании чего вся деятельность биофабрик должна быть ориентирована на разработку, внедрение и производство современных, эффективных и безопасных препаратов. Дополнительным стимулом для производителей стала государственная программа импортозамещения, ориентированная на плановое замещение иностранных препаратов отечественными

разработками. Основная сложность реализации задач по разработке новых средств специфической профилактики, заключается в необходимости подбора штаммов микроорганизмов, отвечающих всем требованиям производственных культур. Не смотря на то, что эта часть исследовательской работы занимает достаточно длительный период времени и требует значительных средств и финансовых ресурсов, она является обязательной [5, 9, 10, 13, 15].

В качестве яркого примера стоит рассмотреть схему подбора штаммов бактерий вида *M. haemolytica*, являющегося возбудителем манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота. Для изготовления вакцин против манхеймиоза могут быть использованы штаммы, относящиеся к серотипу А1, как единственному из 17 известных серотипов, имеющего этиологическое значение, вирулентные для животных и обладающие высокой антигенной активностью, то есть способностью индуцировать образование антител у подопытных животных. Ввиду отсутствия коммерческих средств серотипирования *Mannheimia haemolytica* возникает необходимость использования для идентификации авторских методик, что подтверждено в работе посредством реакции непрямой гемагглютинации, предложенной Е.Л. Биберстейном, при наличии культур с изначально известным серотипом [1-3, 12].

После подтверждения серотиповой принадлежности необходимым является определение патогенности и вирулентности культур, так как чем выше вирулентность производственного штамма, тем выше его активность в инаktivированных препаратах.

После определения наличия патогенных и вирулентных свойств культур обязательным является определение активности препаратов, изготовленных из данных культур. В настоящее время определить активность бактериальных препаратов можно двумя основными способами: первый из которых это определение иммуногенной активности, что подразумевает заражение иммунизированных животных вирулентной культурой; второй метод подразумевает определение антигенной активности путём определения изменений титра антител после иммунизации животных в серологических реакциях. В нашем случае, в связи с биологическими особенностями *Mannheimia haemolytica*, восприимчивыми к заражению являются исключительно жвачные животные, при этом воспроизвести инфекцию, а соответственно и определить иммуногенную активность, достаточно сложно, так как лабораторные животные сложно поддаются инфицированию. Именно данная особенность обуславливает выбор метода контроля активности посредством определения титра антител [4, 6, 7, 8, 11, 14].

В собственных результатах подробно расписаны методики проведения и результаты подбора нового производственного штамма *Mannheimia haemolytica* «КЛ - ВИЭВ».

Цель исследования заключалась в отборе эпизоотического штамма бактерий вида *Mannheimia haemolytica*, соответствующего свойствам производственной культуры, и пригодного для разработки и изготовления вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данная научная работа является частью государственного задания «Разработка технологии изготовления и методов контроля инаktivированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота» (№ 0578-2016-0002). Работы проводилось в 2016-2017 гг. на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко», а также на опытной базе Вышневолоцкого филиала ВИЭВ (о. Лисий).

Изучение эпизоотической ситуации по данному заболеванию, клиническое обследование животных, патологоанатомическое исследование трупов, бактериологические исследования клинического и секционного материала от павших и вынужденно убитых животных с целью выделения инфекционного агента, проводили в животноводческих хозяйствах Московской, Тульской, Смоленской, Владимирской,

Калужской, Тверской, Новгородской, Нижегородской, Белгородской, Орловской, Рязанской, Курской, Кировской, Тамбовской, Челябинской, Пензенской областей, Ставропольском и Краснодарском краях и Республики Мордовия.

Микробиологическое исследования для выделения из патологического и клинического материала бактерий вида *Mannheimia* spp., были проведены согласно действующим «Методическим указаниям по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц № 22-7/82 от 20.08.1992 г.».

При проведении комплексного микробиологического исследования использованы следующие питательные среды: желатиновая среда, модифицированный эскулиновый агар, эскулиновый бульон, среда Кларка, нитратный бульон, агар с мочевиной Кристенсена, трехсахарный агар с железом, агар МакКонки, агар с феноловым красным, колумбийский агар, сердечно-мозговой агар, бульон с феноловым красным, эугоник агар, эугоник бульон, агар с бромкрезоловым пурпурным, бульон с бромкрезоловым пурпурным, мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, полужидкий агар, пептонная вода с индикатором Андрее, триптон соевый бульон, триптон соевый агар, триптон-цистиновый агар, бульон Хоттингера производства ООО «ХайМедиаЛабс» и фирмы «Oxoid» (Великобритания).

Для родовой и подвиговой идентификации выделенных изолятов бактерий семейства Pasteurellaceae, использованы следующие коммерческие тест системы: RapID NF Plus Panel (R8311005), API® NH, API® 20 E, API® 20 NE - ID 32 E с сопутствующими расходными принадлежностями и электронной базой для интерпретации полученного результата. Помимо коммерческих тест-систем были использованы углеводы в дисках для определения сахаролитических свойств выделенных изолятов: адонит, арабиноза, галактоза, D-глюкоза, дульцит, инозит, инулин, ксилоза, мальтоза, маннит, манноза, раффиноза, рамноза, салицит, сорбит, сахароза, трегалоза, фруктоза, целлобиоза производства Himedia.

Определение патогенных, вирулентных и иммуногенных свойств штаммов манхемий проводили в виварии Вышневолоцкого филиала ВИЭВ с использованием белых мышей массой 16-18 гр., и морских свинок массой 350-400 гр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

За указанный период времени из материала, поступившего из разных регионов РФ, было выделено 5 изолятов, идентифицированных как *Mannheimia haemolytica*, а именно: «КЛ-ВИЭВ» (Белгородская область), «АМ9» (Челябинская область), №219, №207 (Республика Мордовия), №217 (Краснодарский Край). Все выделенные культуры манхемий обладали типичными для своего вида культуральными, морфологическими, тинкториальными и биохимическими свойствами.

Для достижения поставленной цели, исследование было разделено на несколько этапов, в частности: серотипирование изолятов, определение патогенности, определение вирулентности, определение антигенной активности.

Серотипирование эпизоотических изолятов манхемий. Поскольку наибольшая этиологическая значимость данного вида бактерий отмечается у серотипа А1, задача заключалась в подтверждении или опровержении принадлежности выделенных нами эпизоотических культур именно к данному серотипу.

Ввиду отсутствия коммерческих средств и наборов для серотипирования *M. haemolytica* нами была выполнена серия опытов по серотипизации полученных штаммов в реакции непрямой гемагглютинации (IHA test), предложенной Е.Л. Биберстейном [2]. Суть данного опыта подразумевала использование культур манхемий заранее известных серотипов в качестве положительного контроля при постановке положительного контроля, т.е. штамм АТСС 33396 относящийся к серотипу А2, производственный штамм №169 и «КМИЭВ-В158» относящиеся к серотипу А1.

Проведение опыта было реализовано согласно следующей методике:

Гипериммунизация морских свинок с использованием полных микробных антигенов *Mannheimia haemolytica*. Для реализации данного этапа исследования от

животных, используемых в опыте, была получена сыворотка крови, используемая в последующем в качестве отрицательного контроля. Затем животным один раз в 7 дней подкожно вводили суспензию инактивированных бактериальных клеток соответствующего штамма в концентрации 6 млрд. мк. кл. в 1 см³ в объеме 2 мл., т.е. концентрация антигена для разового введения составила 12 млрд. мк. кл.. Иммунизацию каждой группы животных провели 7 раз в течение 42 дней, соответственно по схеме 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 день. За весь период проведения опыта ни одно из животных не погибло, а также не проявляло никаких изменений в отношении подвижности, потребности в воде и корме в сравнении с контрольными животными, не подвергавшихся иммунизации. Отбор крови для получения сыворотки производился спустя 14 дней после последней инъекции. Сыворотки от соответствующих групп опытных животных объединялись.

Получение капсульного антигена для постановки реакции непрямо́й гемагглютинации было выполнено с использованием суточной культуры *M. haemolytica*, выращенной на триптон-соевом бульоне. Бульонную культуру подвергали термической инактивации при 60 °С с экспозицией 30 минут. С целью получения супернатанта инактивированная нагреванием бактериальная масса была подвергнута центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 минут, после чего надосадочная жидкость перемещалась в стерильную пробирку типа Falcon и использовалась в последующем в качестве капсульного антигена при постановке реакции непрямо́й гемагглютинации. Таким образом были получены капсульные антигены всех имеющихся штаммов манхемий («КЛ-ВИЭВ», «АМ9», № 219, № 207, №217, ATCC 33396, №169, «КМИЭВ-В158») в необходимом для проведения опытов количестве.

Получение эритроцитов крови крупного рогатого скота. Для постановки реакции непрямо́й гемагглютинации необходимым условием являлось наличие эритроцитов восприимчивых видов животных. Для этого от молодого бычка была получена дефибринированная кровь в объёме 250 мл. В последующем дефибринированная кровь, для осаждения более тяжёлых форменных элементов, подвергали центрифугированию при 2500 об./мин., продолжительностью 5 минут. После чего эритроциты дважды подвергались промывке солевым раствором фосфатного буфера, с последующим повторном центрифугировании при аналогичном режиме, до получения прозрачной надосадочной жидкости. Полученные эритроциты использовались в течение трёх дней с момента получения.

Адсорбция капсульных антигенов на поверхности эритроцитов. Эритроциты крупного рогатого скота в объёме 0,2 мл смешивались с 20 мл капсульного антигена каждого штамма. С целью прочной фиксации адсорбированных антигенов на эритроцитах в смесь добавляли 200 мкл глутаральдегида, после чего смесь инкубировали при 37 °С в течение 1 часа, при плавном перемешивании. В результате выполнения данной процедуры нами были получены адсорбированный эритроцитами антиген. Для концентрирования эритроцитов и удаление не связавшегося антигена смесь была подвергнута двойному центрифугированию при 2500 об./мин., в течение 5 минут с промывкой PBS. После второго центрифугирования и удаления супернатанта, оставшийся объём эритроцитов был ресуспендирован в PBS до достижения конечной концентрации эритроцитов равной 1%.

Постановка реакции непрямо́й гемагглютинации (IHA test). Для выполнения данного этапа исследования были использованы одноразовые стерильные 96 луночные планшеты с U-образным дном. Порядок расположения проб, а также результаты реакции приведены в таблицах 1, 2, 3. Ввиду наличия трёх антисывороток (ATCC 33396, №169 и «КМИЭВ-В158») титрование сенсibilизированных эритроцитов проводилось для каждой в отдельном планшете.

Принцип проведения реакции:

1. Во все лунки планшета (A1-H12) вносилось 50 мкл PBS.
2. В лунки первого вертикального ряда (колонки) была внесена антисыворотка, полученная от животных, гипериммунизированных определённым штаммом в объёме 50 мкл.

3. Проводили двукратное титрование содержимого лунок колонок 1-11.
4. Для достижения равного объёма смеси во всех лунках из лунок колонки 11 было удалено 50 мкл смеси. Таким образом все лунки содержали 100 мкл смеси.
5. Во все лунки планшета вносили по 50 мкл сенсibilизированных антигеном эритроцитов.
6. Инкубирование планшетов проходило при температурном режиме 37 °С в течение 1 часа, без встряхивания.
7. Учёт результата проводили визуально по полноте агглютинации. Положительной результат признавали в случаи агглютинации эритроцитов, имеющих вид перевернутого «зонтика», а отрицательный при оседании эритроцитов на дне в виде равномерного диска. За титр сыворотки принимали последнее её разведение, в котором наблюдалась гемагглютинация.

Таблица 1 – Результаты реакции непрямой гемагглютинации с использованием антисывороток, полученных при гипериммунизации морских свинок штаммом №169

Эритроциты + антиген		Разведение											
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Отр. контр.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
КЛ-ВИЭВ	A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AM9	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 219	C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 207	D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№217	E	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ATCC 33396	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№169	G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
КМИЭВ-B158	H	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Отрицательный контроль, с использованием сыворотки, полученной до начала гипериммунизации свинок, был поставлен в лунках 12-ого вертикального ряда и продемонстрировал отсутствие агглютинации с сенсibilизированными эритроцитами.

Как видно из таблицы №1, сыворотка, полученная от животных, гипериммунизированных штаммом №169, демонстрирует положительную реакцию агглютинации со штаммами «КЛ-ВИЭВ», №217, №169 и «КМИЭВ-B158» в разведении 1:128, 1:32, 1:256 и 1:128 соответственно. Агглютинация сыворотки с антигеном штаммов № 219 и № 207 не рассматривали как специфическую связь ввиду низкой степени разведения.

Таблица 2 – Результаты реакции непрямой гемагглютинации с использованием антисывороток, полученных при гипериммунизации морских свинок штаммом «КМИЭВ-B158»

Эритроциты + антиген		Разведение											
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Отр. Контр.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
КЛ-ВИЭВ	A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AM9	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 219	C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 207	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№217	E	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 33396	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№169	G	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
КМИЭВ-B158	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Как видно из таблицы №2 сыворотка, полученная от животных, гипериммунизированных штаммом «КМИЭВ-B158», демонстрирует положительную реакцию агглютинации с штаммами «КЛ-ВИЭВ», №217, №169 и «КМИЭВ-B158» в разведениях 1:128, 1:16, 1:64, 1:512 соответственно. Агглютинацию сыворотки с антигеном штамма № 219 мы не рассматривали как специфическую связь ввиду низкой степени разведения.

Как видно из таблицы №3, сыворотка, полученная от животных, гипериммунизированных штаммом ATCC 33396, демонстрирует положительную

реакцию агглютинации с штаммами ATCC 33396 и AM9 в разведениях 1:512 и 1:128 соответственно.

Таблица 3 – Результаты реакции непрямой гемагглютинации с использованием антисывороток, полученных при гипериммунизации морских свинок штаммом ATCC 33396

Эритроциты + антиген		Разведение											
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Отр. Контр.
КЛ-ВИЭВ	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
№ 219	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 207	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№217	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 33396	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
№169	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
КМИЭВ-В158	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Результатом проведенного опыта можно считать то, что штаммы бактерий вида *M.haemolytica* №169, «КМИЭВ-В158», «КЛ-ВИЭВ» и №217 в реакции непрямой гемагглютинации, предложенной Биберстейном Е.Л., имеют гомологичный капсульный антиген, что говорит о принадлежности их к серотипу A1. Также при проведении опыта установлено, что штамм AM9 гомологичен по капсульному антигену штамму ATCC 33396, что стоит рассматривать как принадлежность к серотипу A2.

Определение патогенных свойств изолятов манхемий. Определив принадлежность эпизоотических культур манхемий к серотипу A1, приступили к изучению патогенности полученных культур манхемий. В первую очередь это связано с тем, что для инактивированных биопрепаратов, чем выше вирулентность штамма, тем выше его иммуногенность, что в свою очередь стоит рассматривать как следствие наличия большего количества факторов патогенности, каждый из которых, по сути, является чужеродным антигеном. Ввиду биологических особенностей данного вида связанных с невосприимчивостью лабораторных животных, при естественных условиях заражения, нами была разработана и апробирована методика определения патогенных свойств манхемий с использованием животных, предварительно подвергшихся иммуносупрессии по следующей методике.

Для опыта использовались мыши относящиеся к категории SPF. Для изучения патогенности каждой культуры использовалось по 4 мыши. Для реализации опыта за 120 часов до инфицирования внутримышечно вводилось 0,01 мл 0,4% раствора дексаметазона, из расчёта 0,5 мг действующего вещества на 1 введение, в течение 4 дней, то есть в промежутках 24, 48, 72, 96 часов. На пятый день мыши подвергались интраназальному инфицированию суточной бульонной культурой штаммов *Mannheimia haemolytica* с концентрацией 5 млрд. мкр. кл. в 1 см³ в объеме 0,2 мл. В качестве контроля использовались четыре мышки так же подвергнувшись иммуносупрессии, но оставшиеся не инфицированными.

Таблица 4 – Результаты изучения патогенности штаммов *Mannheimia haemolytica* при интраназальном заражении мышей подвергнувшихся иммуносупрессии дексаметазоном

Номер штамма	Количество животных		Период гибели после заражения (дней)
	Заражено	Пало	
КЛ-ВИЭВ	4	4	2-5
AM9	4	2	3-4
№219	4	1	4
№207	4	1	3
№217	4	4	3-5
№169	4	4	2-5
КМИЭВ-В158	4	4	2-4
ATCC 33396	4	1	4
Контроль	4	0	-

Период наблюдения за животными составил 7 дней. Результаты проведения опыта приведены в таблице 4.

Как видно из представленных результатов, погибли все животные группы, зараженные штаммами «КЛ-ВИЭВ», №217, №169 и «КМИЭВ-В158», что в свою очередь является свидетельством наличие у данных культур патогенных свойств.

Определение вирулентности изолятов манхемий. Определив наличие у культур манхемий патогенных свойств, стало необходимым определение их вирулентности по показателю LD₅₀, которое было произведено с использованием лабораторных животных, искусственно подвергнувшихся иммуносупрессии с помощью дексаметазона. Определение степени патогенности проводилось только для патогенных штаммов, то есть «КЛ-ВИЭВ», №217.

Для каждого штамма было сформировано по четыре группы белых мышей, по 4 мышки в каждой группе. Заражение мышей проводилось по ранее описанной методике с использованием дексаметазона, с целью понизить иммунный статус животных. Заражение различных групп проводилось соответствующими десятикратными разведениями бактериальных клеток: 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶. Результаты определения вирулентности штаммов манхемий приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты определения величины LD₅₀ для штаммов *Mannheimia haemolytica* на белых мышах при интраназальном способе заражения

Изолят	Инфицирующая доза, мкр. кл.	Количество зараженных животных, гол.	Погибло, гол.	LD ₅₀ мкр. кл.
КЛ-ВИЭВ	3.52*10 ⁹	4	4	352000000
	3.52*10 ⁸	4	2	
	3.52*10 ⁷	4	0	
	3.52*10 ⁶	4	0	
№217	3.44*10 ⁹	4	4	482135323
	3.44*10 ⁸	4	1	
	3.44*10 ⁷	4	0	
	3.44*10 ⁶	4	0	

В качестве пояснения, стоит сразу обозначить, что значения инфицирующей дозы 3.52 и 3.44 были получены при определении количества жизнеспособных клеток в инфицирующей суспензии чашечным методом из последних трёх разведений, из расчёта на 0,2 см³.

Как видно из данных, приведённых в таблице №5, штамм «КЛ-ВИЭВ» обладает большей вирулентностью, чем штамм №217, на основании чего именно его мы в первую очередь рассматриваем в качестве производственного.

Определение иммуногенных свойств изолятов манхемий. С целью дальнейшего изучения свойств штаммов манхемий «КЛ-ВИЭВ» и №217 было проведено определение антигенной активности монопрепаратов изготовленных из данных штаммов. Суть опыта заключалась в иммунизации морских свинок с последующим определением титром антител в реакции агглютинации. В ранее проведённом опыте была установлена возможность использования реакции непрямой гемагглютинации для серотипирования штаммов манхемий по капсульному антигену, которую в свою очередь можно использовать для определения титров антител, но ввиду сложности и длительности этапов воспроизведения данной реакции, по сравнению с реакцией агглютинацией, выбор был остановлен на последнем методе.

С целью воспроизведения опыта было сформировано три группы морских свинок, по 5 голов в каждой, из которых первая группа была иммунизирована моновакциной изготовленной из штамма *M. haemolytica* «КЛ-ВИЭВ», вторая группа была вакцинирована монопрепаратом из штамма *M. haemolytica* №217, третья группа являлась контрольной, ввиду чего животным водился стерильный физиологический раствор в соответствующем объёме. В качестве адъюванта использовали гель гидроокиси алюминия. Препараты животным опытных групп вводили подкожно двукратно с интервалом 21 день в объёме 1 см³, концентрация бактериальных клеток в

1 мл составила 6 млрд. мкр. кл. см³. Выбор данного адъюванта для контроля антигенной активности был случайным, так как цель стояла в сравнении антигенной активности штаммов, а не в стремлении усиления антигенности путём подбора адъюванта.

Принцип подготовки и постановки реакции агглютинации:

Гипериммунизация животных опытных групп проводилась в соответствии с ранее описанным методом с использованием полных бактериальных клеток. Получение сыворотки крови от опытных и контрольных животных проводилось трёхкратно, т.е. перед первой вакцинацией, перед второй вакцинацией, спустя 14 дней после второй вакцинации. Полученные сыворотки были использованы сразу после получения, или были однократно заморожены при температурном режиме -18 °С.

Получение соматического антигена *M. haemolytica* было выполнено аналогичным методом описанном ранее при постановке реакции непрямой гемагглютинации с некоторыми изменениями: бульонную культуру подвергали термической инактивации при 60 °С с экспозицией 30 минут. Для получения антигена использовали осадок, для чего инактивированная нагреванием бактериальная масса, была подвергнута центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 минут. После окончания операции надосадочная жидкость удалялась, а осадок ресуспендировался в 25 мл физиологического раствора до достижения концентрации 2 млрд. мкр. кл. см³, с последующим инкубированием при 37 °С в течении 12 часов, после чего суспензию повторно центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, а осадок последовательно промывали в PBS при pH 5,0, 6,0 и 7,0 соответственно. После проделанных манипуляций устанавливали концентрацию соматического антигена 2 млрд. мкр. кл. см³, с использованием PBS при pH 7,0.

Таблица 6 – Результаты опыта по определению антигенной активности штаммов манheimий в реакции агглютинации в отношении соматического антигена *Mannheimia haemolytica*

Группа животных	Номер животного	Титры антител с оценкой два креста и выше в сыворотке крови морских свинок		
		До вакцинации	После первой вакцинации	После второй вакцинации
КЛ-ВИЭВ	1	0	1:200	1:800
	2	0	1:400	1:800
	3	0	1:400	1:800
	4	0	1:400	1:1600
	5	0	1:400	1:800
№217	6	0	1:400	1:800
	7	0	1:100	1:800
	8	0	1:200	1:800
	9	0	1:200	1:400
	10	0	1:400	1:800
Контроль	11	0	0	0
	12	0	0	0
	13	0	0	0
	14	0	0	0
	15	0	0	0

Постановка реакции агглютинации проводили следующим образом: на чистое обезжиренное предметное стекло наносится капля испытуемой сыворотки в разном разведении (1:25-1:3200) с последующим внесением в неё равного объёма соматического антигена. Образование мелкозернистой агглютинации является свидетельством наличия в испытуемой сыворотке титров антител к используемому антигену. Поскольку при постановке реакции агглютинации разведения сыворотки начинались с разведения 1:25, более низкий уровень антител не определялся.

Параллельно ставили контроль самоагглютинации антигена *M. haemolytica*, смешивая соматический антиген с физиологическим раствором. Самоагглютинация отсутствовала.

Отрицательным контролем служили сыворотки крови, полученные от животных до начала опыта, то есть до первой вакцинации. Отрицательные сыворотки не агглютинировали с антигенами.

Реакцию учитывалась только при четких значениях показателей всех контролей. Результаты опыта приведены в таблице 6. Как видно из приведённой выше таблицы, у всех животных контрольной группы, которым вводился физиологический раствор, на всех этапах проведения опыта не было обнаружено титров антител к антигену *M. haemolytica*. Аналогичная ситуация наблюдалась при исследовании в реакции агглютинации сывороток крови, полученных от опытных животных до первой иммунизации. Средний титр антител у животных, подвергшихся однократной иммунизации антигеном *M. haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» составил 1:360, в то время как значение данного показателя для штамма *M. haemolytica* №217 составило 1:260. Повторная иммунизация антигеном *M. haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» позволила увеличить титры антител до 1:960, в то время как значение аналогичного показателя для антигена *M. h.* №217 составило 1:720.

Из полученных данных можно сделать заключение, что штамм «КЛ-ВИЭВ» в сравнительном аспекте с *M. haemolytica* №217 обладает большей антигенной активностью для морских свинок при однократном и двукратном инъектировании. Ввиду чего, становится логичным выбор данного штамма для использования в качестве производственного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате бактериологических исследований проб патологического материала, проведённых в 2015-2017 годах, было выделено 5 культур *M. haemolytica*. Имея предварительную цель разработать вакцину против манheimиоза крупного и мелкого рогатого скота была предопределена задача по подбору производственного штамма, из имеющихся полевых изолятов. Для реализации поставленной задачи необходимо было выполнение ряда опытов, направленных на изучение свойств этих культур, а именно определение серотиповой принадлежности, подтверждение наличия патогенных и вирулентных свойств, а также определение антигенной активности монопрепаратов, изготовленных из полученных культур манheimий.

В результате определения серотиповой принадлежности в реакции непрямой гемагглютинации по методике, предложенной Е.Л. Биберстейном, было установлено, что изоляты «КЛ-ВИЭВ» и №217 относятся к серотипу А1, что подтверждает их этиологическую значимость.

При определении патогенности и вирулентности штаммов манheimий на лабораторных животных, подвергнувшихся предварительной иммуносупрессии, было установлено, что значение показателя LD₅₀ для штамма «КЛ-ВИЭВ» составила $3,5 \cdot 10^8$ мкр. кл., а вирулентность культуры №217 была равна $4,8 \cdot 10^8$ мкр. кл., ввиду чего штамм «КЛ-ВИЭВ» более вирулентный.

При определении антигенной активности монопрепаратов, изготовленных из изучаемых штаммов, было доказано, что средний титр антител у животных, подвергшихся однократной иммунизации антигеном «КЛ-ВИЭВ» составил 1:360, в то время как значение данного показателя для штамма *M. haemolytica* №217 составило 1:260. Повторная иммунизация антигеном *M. haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» позволила увеличить титры антител до 1:960, в то время как значение аналогичного показателя для антигена *M. haemolytica* №217 составило 1:720, что в свою очередь говорит о большей антигенной активности штамма «КЛ-ВИЭВ».

На основании полученных данных, штамм *M. haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» рекомендуется к использованию в качестве производственного. Все изоляты *M. haemolytica*, выделенные в ходе выполнения работы, были депонированы в Всероссийской коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко.

Подобранный штамм, наиболее подходящий для использования в биопроизводстве, депонирован в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» под названием «КЛ-ВИЭВ».

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Aulik N.A. Mannheimia haemolytica and its leukotoxin cause neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils // *Infection and Immunity*. 2010. Т. 78. № 11. С. 4454-4466.
2. Biberstein EL. Gills M., Knight H. Serological types of Pasteurella hemolytica. // *Cornell Veterinarian* 1960; 50: 283–300
3. Bisgaard M. Investigations on the species specificity of Mannheimia (pasteurella) haemolytica serotyping // *Veterinary Microbiology*. 1999. Т. 65. № 4. С. 283-290.
4. Katsuda K. Molecular typing of Mannheimia (pasteurella) haemolytica serotype a1 isolates from cattle in Japan // *Epidemiology and Infection*. 2003. Т. 131. № 2. С. 939-946.
5. Kolesnikova Y.N. The etiology of anaerobic infections of cattle and comparative characteristics of the isolated strains of clostridium // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016. Т. 56. № 8. С. 39-48.
6. Laishevtcev A.I. Features of biochemical identification and differentiation of Mannheimia haemolytica // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016. Т. 54. № 6. С. 70-77.
7. Lo R.Y.C. Genetic analysis of virulence factors of Mannheimia (pasteurella) haemolytica a1 // *Veterinary Microbiology*. 2001. Т. 83. № 1. С. 23-35.
8. McNeil H.J. Mannheimia haemolytica serotype one and pasteurella trehalosi serotype 10 culture supernatants contain fibrinogen-binding proteins // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2002. Т. 90. № 1-2. С. 107-110.
9. Tatarenko Y.S. The study of pathogenic properties of enterobacterial flora of clinically healthy quails for possible detection of bacteriocarrier // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016. Т. 56. № 8. С. 67-73.
10. Verkhovsky O.A. Structural composition of the bacterial and fungal microflora in the eyes of cattle with an infectious keratoconjunctivitis // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016. Т. 57. № 9. С. 97-104.
11. Zecchinon L. How Mannheimia haemolytica defeats host defence through a kiss of death mechanism // *Veterinary Research*. 2005. Т. 36. № 2. С. 133-156.
12. Капустин А.В. Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей // *Методические указания*, Москва, 2016.
13. Капустин А.В. Изучение эффективности применения поливалентной вакцины «Клостбовак-8» на неблагополучном по злокачественному отёку, браздоту и анаэробной энтеротоксемии поголовье мелкого рогатого скота // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2016. № 11. С. 33-40.
14. Кострова Е.С. Разработка тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для определения титра антител к Mannheimia haemolytica в сыворотках крови крупного рогатого скота // *Ветеринария сегодня*. 2017. № 1 (20). С. 34-37.
15. Скляр О.Д. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота // *Ветеринария Кубани*. 2016. № 4. С. 15-17.