

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА и Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

На правах рукописи

ЛАИШЕВЦЕВ АЛЕКСЕЙ ИВАНОВИЧ

**Клинико-эпизоотологическое обоснование вакцинопрофилактики
и разработка вакцины против маншеймиоза крупного и мелкого
рогатого скота**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология;
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

кандидат ветеринарных наук, доцент
Капустин Андрей Владимирович
доктор биологических наук, профессор
Пименов Николай Васильевич

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ	5
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
2.1.	Пастереллёзные инфекции. Характеристика <i>Mannheimia haemolytica</i>	11
2.1.1.	Физико-биологические особенности <i>Mannheimia haemolytica</i>	12
2.1.2.	Факторы патогенности <i>Mannheimia haemolytica</i>	16
2.1.3.	Видовая восприимчивость	19
2.1.4.	Предрасполагающие к развитию заболевания факторы	19
2.1.5.	Патогенез	21
2.1.6.	Клинико-морфологическое проявление пастереллёза крупного и мелкого рогатого скота, вызванного <i>Mannheimia haemolytica</i>	23
2.2.	Лабораторная диагностика	27
2.3.	Лечебные мероприятия при пастереллёзе вызванном бактериями вида <i>Mannheimia haemolytica</i>	28
2.4.	Специфическая профилактика манхеймия-инфекции крупного и мелкого рогатого скота	29
2.5.	Заключение	32
3.	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
3.1.	Материалы	33
3.2.	Методы	37
3.2.1.	Микробиологические	37
3.2.2.	Биотехнологические	40
3.2.3.	Клинические	44
3.2.4.	Патологоанатомические	44
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
4.1.	Клинико-морфологическое проявление манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота	46
4.2.	Совершенствование лабораторной диагностики манхеймиоза	57
4.3.	Эпизоотологические данные по пастереллёзу и манхеймиозу крупного и мелкого рогатого скота	64
4.4.	Обоснование необходимости создания и применения вакцины инактивированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота	66
4.5.	Характеристика выделенных изолятов <i>Mannheimia haemolytica</i>	68
4.6.	Определение этиологически значимых культур <i>Mannheimia haemolytica</i>	71
4.7.	Выявление иммуногенных и антигенных изолятов <i>Mannheimia</i>	

	haemolytica	82
4.8.	Отбор и депонирование производственного штамма <i>Mannheimia haemolytica</i>	85
4.9.	Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота	86
4.10.	Разработка методов контроля вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак»	102
4.11.	Изучение протективной активности экспериментальных серий вакцины на лабораторных объектах	102
4.12.	Определение безопасности применения препарата	103
4.13.	Антигенная активность биопрепарата на естественно восприимчивых видах животных	106
5.	ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	108
6.	ВЫВОДЫ	121
7.	ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	123
8.	РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАБОТКИ ТЕМЫ	124
9.	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	125
10.	ПРИЛОЖЕНИЯ	138

Список сокращений

гол. – голов;

д.д./мин. – дыхательных движений в минуту;

др. – другие;

ЗАО – Закрытое акционерное общество;

КОЕ – колоний образующие единицы;

мес. – месяцев;

мин. – минут;

мкр. кл. – микробных клеток;

млн. мкр. кл. – миллионов микробных клеток;

млрд. мкр. кл. – миллиардов микробных клеток;

МПА – мясо-пептонный агар;

МПБ – мясо-пептонный бульон;

МППБ – мясо-пептонный печеночный бульон;

нм – нанометр;

об./мин. – оборотов в минуту;

ПЭГ – полиэтиленгликоль;

РА – реакция агглютинации;

РН – реакция нейтрализации;

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации;

см. – смотри;

соавт. – соавторы.

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Животноводство – стратегическая отрасль сельского хозяйства, обеспечивающая продовольственную независимость страны молочной и мясной продукцией [64, 86, 89]. Для стабильного развития животноводства необходимым является выполнение двух условий: во-первых, обеспечение сохранности и роста поголовья, во-вторых, обеспечение постоянного увеличения производимой продукции, ввиду увеличения потребителей и их потребностей. Сложность выполнения обоих условий заключается в необходимости предотвращения снижения продуктивности, массового падежа животных или вынужденного убоя в случаях развития эпизоотий. Среди всех инфекционных болезней в нашей стране на особом месте находится пастереллёз как наиболее часто встречаемая инфекция разных видов сельскохозяйственных животных и птиц с обширной зоной распространения [1, 6, 26, 30, 101]. В соответствии с современными сведениями о данном заболевании его возбудителями являются два различных вида микроорганизмов – *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* [24, 59, 72, 30, 33, 36].

Этиологическое значение бактерий семейства Pasteurellaceae, в частности вида *Mannheimia haemolytica*, в развитии респираторных инфекций у крупного и мелкого рогатого скота признаётся ветеринарными специалистами всего мира, как наиболее острая проблема, влекущая за собой огромные экономические затраты [9, 40, 100, 101]. Возбудитель *Mannheimia haemolytica* известен в научных и учебно-методических работах отечественных специалистов как *Pasteurella haemolytica* и, наряду с бактериями вида *Pasteurella multocida*, признаётся важным этиологическим фактором пастереллёза, но информация о данном возбудителе и его патогенности является недостаточной. Так, в «Методических указаниях по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц» №22-7/82 от 20.08.1992» приведены скудные данные о характеристике этого возбудителя. Иные специальные регламенты не учитывают особенностей эпизоотического процесса, клинкоморфологических проявлений и лабораторной диагностики патологии, вызванной *Mannheimia haemolytica*, а также принципов лечебно-профилактических мероприятий именно при манхемия-инфекции.

Степень разработанности темы исследования. Достижения Российских учёных в вопросах касаемых пастереллёза вызванного *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* являются неоспоримыми, но на основании новых данных о возбудителе, внедрению в практику новых методических подходов и принципов, а также появлению более совершенных средств диагностирования, профилактирования и лечения необходимым является всестороннее изучение каждой патологии в индивидуальности [33, 35, 36, 66, 90]. Так, в настоящее время достаточно изучены особенности пастереллёза вызванном *Pasteurella multocida*, но систематизированных данных об инфекционной патологии, спровоцированной *Mannheimia haemolytica* не хватает [41, 42]. В Российских научных данных сложно найти особенности течения и проявления манхемия-инфекции, её диагностирования, лечения и профилактирования. В частности, остаются недостаточно изученными вопросы формирования иммунитета и иммунопрофилактики пастереллёза, вызванного бактериями вида *Mannheimia haemolytica* – манхеймиоза [53, 61, 113, 128, 145]. Не доказана возможность и эффективность профилактирования пастереллёза, вызванного бактериями *Mannheimia haemolytica*, биопрепаратами, содержащими антиген *Pasteurella multocida* и наоборот [24]. Сложившаяся ситуация зачастую приводит к выбору некорректной тактики борьбы с инфекцией. Так, в соответствии с вышеупомянутыми методическими указаниями по лабораторной диагностике пастереллёзов, при выделении из секционного и/или клинического материала бактерий вида *Mannheimia haemolytica* устанавливается диагноз пастереллёз, для специфической профилактики и терапии которого используются биопрепараты, основным антигеном которых является *Pasteurella multocida*. Эффективность таких средств при манхеймия-инфекции сомнительна и требует научного обоснования подходов к вакцинопрофилактике.

Вышеизложенные доводы подчёркивают важность проведения научных исследований в направлении специфической профилактики пастереллёзов сельскохозяйственных животных на грани нескольких дисциплин, в частности эпизоотологии, микробиологии, биотехнологии, иммунологии и т.д.

Цель и задачи исследования. Целью настоящих исследований явилось изучение особенностей клинико-морфологического проявления пастереллёза крупного и мелкого рогатого скота, вызванного бактериями вида *Mannheimia haemolytica*, разработка технологии изготовления и методов контроля инаktivированной вакцины против манхеймиоза.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить эпизоотическую обстановку по пастереллезу и манхеймиозу крупного и мелкого рогатого скота на территории РФ;
2. Изучить особенности клинико-морфологического проявления манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота;
3. Обосновать необходимость создания и применения вакцины инаktivированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота;
4. Выделить и изучить свойства изолятов возбудителя манхеймиоза рогатого скота;
5. Подобрать штамм *Mannheimia haemolytica*, соответствующий свойствам контрольно-производственного для изготовления вакцинопрепаратов;
6. Разработать технологию изготовления инаktivированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота;
7. Разработать методы контроля инаktivированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота;
8. Провести производственные испытания экспериментальной серии вакцины инаktivированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота.

Научная новизна. Обосновано нозологическое обособление инфекционной патологии, вызванной *Mannheimia haemolytica*, изучены современные эпизоотические данные и клинические особенности манхеймиоза.

На основании изученных особенностей клинико-морфологических проявлений и эпизоотологических данных при пастереллёзе крупного и мелкого рогатого скота, вызванном бактериями вида *Mannheimia haemolytica*, научно обоснован метод специфической профилактики данного инфекционного заболевания с использованием разработанной инаktivированной вакцины.

Изучены биологические свойства возбудителя, в государственной коллекции ФБУН «ГНЦ ПМБ» депонирован новый штамм бактерий *Mannheimia haemolytica* «КЛ-ВИЭВ», удовлетворяющий требованиям производственного штамма для изготовления инактивированных вакцин против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота.

Разработана технология изготовления и промышленного производства нового средства иммунопрофилактики манхеймиоза – вакцины инактивированной эмульгированной «Манхемвак», разработаны её методы контроля, способ применения. Изучена эффективность экспериментальных серий вакцины инактивированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота в производственных условиях молочно-товарных ферм и овцеферм.

Теоретическая и практическая значимость. Эпизоотические штаммы бактерий *Mannheimia haemolytica* паспортизированы и депонированы в государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко, ФБУН «ГНЦ ПМБ» и впервые использованы как производственные для создания средств специфической профилактики.

Разработаны стандарт организации ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко «Производственные и контрольные штаммы *Mannheimia haemolytica*. Метод изготовления и контроля посевных материалов», стандарт организации ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко «Вакцина против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированная «Манхемвак», «Временная инструкция на применение вакцины Манхемвак», промышленный технологический регламент на производство и контроль вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак». Вакцина и способ её применения позволяют усовершенствовать противоэпизоотическую работу при манхеймиозе.

Разработаны и утверждены РАН методические указания «Диагностика манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота» и «Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей».

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования.

Предметом научного исследования стала разработка технологии изготовления и методов контроля инаktivированного иммунобиологического препарата против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота. Объектами исследования выступали штаммы микроорганизмов вида *Mannheimia haemolytica*, изолированные в ходе проведения лабораторно-диагностических исследований, лабораторные, а также естественно восприимчивые животные. Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами. В работе были использованы эпизоотологические, бактериологические, серологические, статистические методы исследований, методы биотехнологии, молекулярной диагностики и другие методы исследований.

Личный вклад соискателя. Автору принадлежат непосредственное осуществление исследований этиологического профиля манхеймиоза сельскохозяйственных животных, выделение и изучение биологических свойств изолятов *Mannheimia haemolytica*, паспортизация и депонирование эпизоотических и контрольно-производственных штаммов, разработка технологического процесса изготовления и методов контроля вакцины инаktivированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота. Автор принимал непосредственное участие во всех испытаниях нового средства и разработке методических указаний по диагностике пастереллёза и манхеймиоза.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена статистической обработкой данных, актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке. Основные результаты исследований доложены на международных научных конференциях: «Наука без границ и языковых барьеров», г. Орёл 13-14.04.2016; «Anthropogenic evolution of modern soils and food production under changing of soil and climatic conditions», г. Орёл, 18-19.01.2016, а также межлабораторных заседаниях ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 8 статей в научных журналах, в том числе 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также два методических указания, утверждённые РАН.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 155 листах машинописного текста и включают: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждения полученных результатов, выводы, сведения о практическом использовании результатов исследований, рекомендации по использованию научных выводов, список использованной литературы (176 источников, в т.ч. 121 – иностранных авторов). Диссертационная работа содержит 19 таблиц, 19 рисунков, 13 приложений на 17 листах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Этиологическая структура пастереллёза сельскохозяйственных животных с обоснованием необходимости выделения инфекционного заболевания, вызванного бактериями вида *Mannheimia haemolytica*, в отдельную нозологическую единицу – «Манхеймиоз»;
2. Современные эпизоотические данные, особенности клинкоморфологического проявления манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота на территории Российской Федерации;
3. Клинико-эпизоотологическое обоснование создания инактивированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота;
4. Технология изготовления, производства, методы контроля, способ применения вакцины инактивированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота;
5. Безвредность и антигенная активность разработанной вакцины. Протективная эффективность.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Пастереллёзные инфекции. Характеристика *Mannheimia haemolytica*

В соответствии с действующей на территории РФ «Инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации пастереллёза животных» пастереллезом является контагиозная инфекционная болезнь сельскохозяйственных, домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением и отёком лёгких, плевритом, а при хроническом течении – гнойно-некротической пневмонией, артритом, маститом, кератоконъюнктивитом, эндометритом и иногда энтеритом [4, 13]. По схожему мнению, Российских и иностранных авторов этиологически значимыми возбудителями данного заболевания являются бактерии видов *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* [1, 23, 24, 33, 60, 119]. При этом существует разделение инфекционных патологий, вызванных данными возбудителями, на несколько нозологических единиц. Так, «Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (млекопитающих, птиц и пчёл)» от 2004 года приводит различные нозологии, вызываемые *Pasteurella multocida*, в частности, геморрагическую септицемию крупного рогатого скота, атрофический ринит свиней, холеру птиц [8]. В остальных случаях заболевание животных, вызванное бактериями видов *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica*, рассматривается как пастереллёз.

Инфекционные заболевания различных видов животных, вызванные видом *Pasteurella multocida*, хорошо изучены и охарактеризованы в ряде иностранных и отечественных научных трудов. Общими вопросами возникновения, развития, проявления, лечения и профилактирования пастереллёзных инфекций, вызванных данным видом микроорганизмов, в России занимались ученые Масимов Н.А., Нурмухамедов Х.Н., Чекулаева Л.Н., Джупина С.И., Заерко В.И., Душук Р.В., Шегидевич Э.А. и другие [2, 6, 7, 9, 11, 25, 29, 32, 38, 40].

При этом недостаточно изученным и охарактеризованным заболеванием является инфекционная патология, вызванная бактериями вида *Mannheimia haemolytica*. В отечественных источниках не существует чёткого разделе-

ния клинико-морфологических проявлений пастереллёза, вызванного *Pasteurella multocida*, и пастереллеза, вызванного *Mannheimia haemolytica*, в отличие от зарубежных стран. Так, в ряде стран пастереллёз, вызванный *Mannheimia haemolytica*, имеет название мангеймиоз (*mannheimiosis*), или мангеймиоз [151, 152, 155].

В соответствии с данными, предоставляемыми А.С. Jaramillo, а также R.A. Mohamed, мангеймиоз – это пастереллез-подобная инфекционная болезнь, преимущественно жвачных видов животных, вызванная возбудителем *Mannheimia haemolytica*, сопровождающаяся обширным поражением респираторной системы [93, 119]. Испанский учёный D. Casalta в своих исследованиях отмечает, что заболеванию предрасположены только жвачные животные, в особенности крупный рогатый скот [69]. К аналогичному мнению пришли российские специалисты Э.А. Шегидевич и Р.В. Душук, которые дополнительно обозначают широкую распространённость заболевания, вызванного *Mannheimia haemolytica*, среди мелкого рогатого скота [39].

2.1.1. Физико-биологические особенности *Mannheimia haemolytica*

Морфологические свойства

В соответствии с определителем Берджи все виды бактерий рода *Mannheimia* обладают плеоморфностью, ввиду чего при микроскопическом исследовании встречаются различные формы и размеры бактериальных клеток. Обычно они выглядят как мелкие грамотрицательные палочки овоидной или кокковидной формы [37]. G.R. Smith с соавт. в 1990 году отметил, что ввиду воздействия внешних факторов и среды, в которой находится возбудитель, меняются его форма и размеры. Так, при культивировании возбудителя на бедных питательных средах или при более низких температурных режимах наблюдается преобладание в культуре удлинённых палочек или даже нитей, в то время как, находясь в тканях патологического материала или экссудата, бактерии данного рода имеют наиболее типичную форму коккобацилл [140]. В ходе изучения свойств суточной культуры микроорганизмов при микрокопировании G.R. Carter в 1967 году зафиксировал

биполярное окрашивание клеток манхемий, наличие капсулы, отсутствие возможности спорулироваться и неподвижность клеток [57]. Данные свойства были подтверждены D.W. Morck в 1987 году и A. Potter в 1988 году, также обнаруживших наличие у бактериального агента фимбрий двух различных типов [121,132].

Культуральные свойства

Согласно определителю нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий, изданному в 1999 году, бактерии рода *Mannheimia* растут на следующих питательных средах: МПБ, МПА, бульон Хоттингера, агар Хоттингера, триптон-соевый бульон, зугоник бульон, зугоник агар, колумбийский агар, ПЖА, агар МакКонки. Лучшее накопление бактериальной массы наблюдается при добавлении 5-10% дефибринированной крови барана или сыворотки крови барана. Оптимальная продолжительность термостатирования бактерий – 18-24 часа при температурном режиме 37-38 °С.

На кровяном агаре *M. haemolytica* растут в виде полупрозрачных колоний 0,5-2 мм в диаметре. При росте на мясо-пептонном агаре с кровью лошади, овцы или кролика отмечается незначительная зона β-гемолиза вокруг колонии, иногда заметная только после снятия колонии. Некоторые изоляты *M. haemolytica* растут на агаре МакКонки и спустя 24 часа термостатирования выглядят как мелкие прозрачные колонии. На МПА возбудитель образует мелкие, округлой формы, выпуклые полупрозрачные колонии. На бульонных средах *Mannheimia haemolytica* вызывают слабое равномерное помутнение среды через 12 часов культивирования. Продолжительность хранения культуры в нативной форме не превышает 2-3 суток при температурном режиме +2+8 °С [3].

Биохимические свойства

Биохимический профиль *Mannheimia granulomatis*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, *Mannheimia ruminalis* и *Mannheimia varigena* впервые был описан ещё в 1999 году O. Angen [47]. Позднее, при изучении свойств данных видов микроорганизмов другими учёными, общая информация была дополнена [46, 52, 86, 87].

Шестой вид бактерий рода *Mannheimia caviae* был выделен относительно недавно и описан группой авторов Н. Christensen, А. М. Bojesen и М. Bisgaard в 2011 году [63]. Биохимические свойства всех видов рода *Mannheimia* приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Биохимические свойства бактерий *Mannheimia*, используемые для идентификации до видовой принадлежности.

Показатель	<i>Mannheimia caviae</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Mannheimia glucosida</i>	<i>Mannheimia ruminalis</i>	<i>Mannheimia granulomatis</i>	<i>Mannheimia varigena</i>
1	2	3	4	5	6	7
Каталаза	+	+	+	+	d	+
Оксидаза	+	+	+	d	d	+
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+	+
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	+	-	d	-	-	d
Аргининдекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-
Образование H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Образование индола	-	-	-	-	-	-
ОНПГ	+	(+)	+	+	d	+
Уреаза	-	-	-	-	-	-
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	-	-	-	-	-
Желатиназа	-	(-)	-	-	-	-
Образование кислоты из:						
D-адонитола	-	-	-	-	-	-
L-арабинозы	+	-	d	-	-	+
Арбутина	+	-	d	-	d	-
Целлобиозы	+	-	d	-	d	-
Декстрина	-	+	+	d	d	d
Дульцитола	+	(-)	-	-	-	-
Фруктозы	+	+	+	+	+	+
D-галактозы	+	+	+	+	+	+
D-глюкозы	+	+	+	+	+	+
Глицерола	+	d	+	d	+	(+)
Инулина	n	-	-	-	-	-
Лактозы	+	+	+	+	d	d
Мальтозы	-	+	+	d	+	d
D-маннитола	+	+	+	+	+	+
D-маннозы	+	(-)	-	-	-	-
Мелицитозы	n	-	-	-	-	-
Мелибиозы	+	-	-	-	-	-
Раффинозы	+	(+)	-	d	d	d

1	2	3	4	5	6	7
L-рамнозы	-	-	-	-	-	+
Салицина	+	-	(+)	d	-	d
D-сорбитола	d	+	+	-	+	-
L-сорбозы	n	-	-	-	-	-
Сахарозы	+	+	+	+	+	+
Трегалозы	n	-	-	-	-	-
D-ксилозы	+	(+)	+	-	-	+
Гидролиз эскулина	+	-	-	-	d	-
Рост на агаре МакКонки	+	d	d	d	-	-
Образование газа из D-глюкозы	n	-	-	-	-	-
В-гемолиз, эритроциты барана	-	+	+	-	-	+
а-Галактозидаза	+	-	-	-	-	-
а-Глюкозидаза	-	-	n	-	-	-

+ – положительное значение теста;

- – отрицательное значение теста;

(+) – в большей степени положительное значение теста;

(-) – в большей степени отрицательное значение теста;

d – вариабельный результат значения теста;

n – не определялись.

Как видно из таблицы 1, бактерии *Mannheimia haemolytica* являются оксидазо- и каталазоположительными, неподвижными микроорганизмами, обладают способностью восстановления нитрата и имеют отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра, не разжижают желатин. Ферментируют D-галактозу, D-глюкозу, D-маннитол, D-фруктозу, сахарозу, мальтозу, арабинозу, D-ксилозу, лактозу, D-сорбитол. Не ферментируют адонитол и трегалозу. Реакция аргининдигидролазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, уреазы, индола – отрицательна.

Антигенная структура

Антигенная структура *Mannheimia haemolytica*, основанная на фенотипических различиях капсулярных полисахаридов, в соответствии с данными E.L. Biberstein, подразумевает наличие 17 серотипов [50]. Так, изоляты серотипов A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 и A17 относятся к *Mannheimia haemolytica*, изоляты серотипов T3, T4, T10 и T15 относятся к *Bibersteinia trehalosi* ранее считавшиеся *Pasteurella trehalosi*, изоляты серотипа A11 – *Mannheimia glucosida* [48, 77, 84, 141]. Данные о серотипировании манхемий посредством определения соматического или иного антигена в литературных данных не встречаются.

В настоящее время существует несколько серологических реакций, позволяющих серотипировать штаммы манхемий, в частности, реакция непрямой гемагглютинации (ИНА тест), предложенная E. L. Biberstein, в 1960 году [50], реакция быстрой пластинчатой агглютинации – RPA-тест, предложенный H. Glynn с соавт. в 1978 году [84], реакция быстрой непрямой гемагглютинации – RИНА-тест, предложенный J. Fraser и другими в 1983 году [78].

Для исключения неоднозначной интерпретации результатов серотипирования манхемий стоит обратить внимание на выделение G.R. Smith в 1959 году двух биоваров *Pasteurella haemolytica* (*M. haemolytica*) – А – ферментирующих арабинозу и Т – ферментирующих трегалозу [139]. Принцип обозначения результатов серотипирования манхемий существенно отличается от обозначения результатов серотипирования пастерелл. Так, серотип манхемий обозначается буквенными и цифровыми символами, например, А1 – где А обозначает принадлежность к биотипу, а символ 1 – к типу «капсульный антиген». Серотипы пастерелл также указываются буквенным и цифровым обозначением, например, А1, где А обозначает принадлежность к типу «капсульный антиген», а символ 1 – принадлежность к соматическому антигену.

В настоящее время коммерческие наборы для серотипизации бактерий данного рода не производятся.

2.1.2. Факторы патогенности *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica, как и все бактериальные агенты, имеют определенный набор факторов, способствующих развитию инфекционного процесса в восприимчивом организме. Наиболее известными факторами вирулентности *Mannheimia haemolytica* являются адгезины, фимбрии, капсула, нейраминидаза, белки внешней мембраны, протеиназы, липополисахариды, лейкотоксины, комплексное влияние которых ведет к развитию патологического процесса в восприимчивом организме [54, 111, 119, 128, 172].

JM. Clarke с соавт. в 2001 году описали, что адгезины *Mannheimia haemolytica* являются фактором, обеспечивающим наилучшую связь

бактериальной клетки с эпителиальной поверхностью респираторных путей. Наличие адгезивной способности повышает устойчивость бактериальной клетки к физическим воздействиям со стороны восприимчивого организма в виде воздушных потоков при дыхании, кашле и выделении мокроты, направленных на удалении данных агентов с поверхности эпителиальных оболочек [64].

При изучении характеристики и свойств адгезинов *Mannheimia haemolytica* не стоит забывать о наличии нейраминидазы, играющей существенную роль при развитии патологического процесса и действующей в симбиозе с адгезинами. Так, DC. Straus, PJ. Unbehagen и CW. Purdy установили, что нейраминидаза *M. haemolytica* – это фермент, имеющий сопутствующую для адгезинов функцию, так как вызывает деградацию слизистых компонентов эпителия, способствующих минимизации колонизации [144].

Особенности строения фимбрий *M. haemolytica* рассмотрены в работах D.W. Morck с соавт., а также R.A. Mohamed и других, по данным которых фимбрии представляют собой отростки на поверхности бактерий. У данного возбудителя отмечается наличие двух, различных по размеру, типов фимбрий: жесткой конструкции с размером 12 нм и гибкой конструкции с размерами 5-нм. Оба типа фимбрий являются средством колонизации бактериями эпителия нижних дыхательных путей и также фактором патогенности [119, 121, 122].

DW. Morck в 1988 году указал на то, что капсула *M. haemolytica* может быть вовлечена в развитие патологического процесса на стадии колонизации респираторного эпителия возбудителем, при этом иных задач данного элемента бактериальной клетки установлено не было [121]. Позднее, в ряде научных работ CJ. Czuprynski, а также CH. Chae была продемонстрирована способность капсулы к ингибированию фагоцитоза нейтрофилами и макрофагами [61, 66, 67].

Белки внешней мембраны, по данным S. Jeyaseelan с соавт., имеют сопутствующее действие в процессе размножения бактериальных клеток [97]. Белки данной группы направлены на обеспечение жизнеспособности микроорганизмов в условиях с минимальным содержанием железа в организме пораженного жи-

вотного, необходимого возбудителю для размножения и продуцирования лейкотоксина [81, 133, 143].

Протеиназа *M. haemolytica* на данный момент не является достаточно изученной, тем не менее, по мнению Y.C. Reggie и соавторов, данный фермент вовлечён в процессы развития патогенеза путем действия на врожденный и адаптивный иммунитет, облегчая процесс колонизации [136].

Изучением лейкотоксина и его свойств занимались многие учёные, мнение которых сошлось на том, что лейкотоксин (далее ЛКТ) – термолабильный кислородостойчивый, водорастворимый протеин [53, 81, 113, 173]. В. Styrт сообщает, что при развитии патологического процесса лейкотоксины играют две основные роли, первая из которых это – защитная функция бактериальной клетки путем разрушения лейкоцитов, вторая роль заключается в высвобождении нейтрофильных веществ, приводящих к повреждению легочных тканей [145].

По данным R.L. Lafleur и соавторов липополисахариды (далее ЛПС) можно считать одним из наиболее важных факторов вирулентности данного возбудителя. ЛПС *M. haemolytica* являются термостабильными эндотоксинами, что обеспечивает защитные свойства возбудителя. Лейкотоксины в комплексе с липополисахаридами образуют высокомолекулярные комплексы, способствующие усилению патогенных свойств друг друга, действуя в синергии [102, 103].

C. Malazdrewich и другие отмечают, что липополисахариды, находящиеся в мембране бактериальной клетки, обеспечивают высокую степень адаптации к окружающим факторам. При этом отмечаются различия в механизмах провоцирования патологического процесса. Так, выявлена способность к стимуляции лейкоцитов с целью продуцирования противовоспалительных цитокинов, активации комплемента свертывания крови и цитолиза клеток [102, 114]. ЛПС обладают способностью провоцирования легочных повреждений, непосредственно токсическим воздействием на легочный эндотелий и воздействием на нейтрофилы. Токсические свойства ЛПС могут быть усилены за счет образования комплекса с фосфолипидами, которые способствуют не только легочной колонизации, но и подавлению защитного действия иммунных клеток, тем самым позволяя возбу-

дителю на этапе внедрения в организм сохраняться на поверхности тканей и инициировать дальнейшие воспалительные процессы [90, 129].

2.1.3. Видовая восприимчивость

В соответствии с литературными данными заболевание регистрируется преимущественно у жвачных животных, в том числе крупного рогатого скота, яков, буйволов, бизонов, мулов, горных козлов, вилорогов, верблюдов, ослов, ламы, альпаки, зебу, овец, коз. В единичных случаях возбудитель был выделен от лошадей и свиней [94, 118, 170]. Кроме того, описаны единичные случаи выделения возбудителя от кроликов, собак и кошек. Kim Jeong Rae и другие описывают выделение бактериального агента от ягуара при ассоциированной гельминтозной инфекции [95]. В Италии авторским коллективом N. Zizzo с соавт. возбудитель был выделен от морской черепахи [176]. По мнению некоторых научных деятелей, возбудитель *Mannheimia haemolytica* является оппортунистическим агентом для страусов, попугаев, соколов, перепелов, павлинов, голубей, индеек, цесарок и уток [51, 62, 68, 76, 115, 127].

2.1.4. Предрасполагающие к развитию заболевания факторы

Развитие респираторного заболевания, вызванного бактериями вида *Mannheimia haemolytica*, требует наличия предрасполагающих условий, снижающих естественную резистентность восприимчивого организма к возбудителю.

По мнению G.H. Frank и P.C. Smith, первым фактором возникновения болезни стоит считать стресс, который может быть классифицирован на психологические и физические. Значение стресс-фактора при развитии патогенеза инфекционной болезни подтверждается множественными наблюдениями, свидетельствующими о резком начале массовых заболеваний после смены погодных или зоогигиенических условий. Причиной возникновения повышенной чувствительности при стрессе можно считать естественное снижение иммунитета [74, 85, 110].

В соответствии с данными T.P. Stossel и соавт., вторым по значимости предрасполагающим к развитию заболевания фактором стоит считать вирусные

заболевания респираторной системы, влекущие за собой увеличение восприимчивости организма. В качестве яркого примера авторы приводят парагрипп крупного рогатого скота, герпесвирусную инфекцию крупного рогатого скота, респираторно-синцитиальную инфекцию, аденовиروзы и реовирусы. При этом именно вирусный агент открывает ворота инфекции для *M. haemolytica* благодаря тому, что снижает резистентность организма [49, 80, 91, 126]. M.R. Dyer и другие сообщают, что на данный момент нельзя считать абсолютно изученными механизмы ассоциированного влияния двух и более патогенных агентов, но имеющиеся закономерности позволяют точно утверждать, что вирусные инфекции способствуют снижению мукоцилиарных механизмов защиты респираторной системы, что, в последующем, использует *M. haemolytica* при колонизации. Первостепенные вирусные агенты снижают фагоцитарную функцию легочных альвеолярных макрофагов, а это оказывает влияние на потерю способности макрофагов к фагоцитарной деятельности и потерю возможности продуцирования хемотаксических факторов другими клетками [71, 96, 115].

Третьим по значимости этиологическим компонентом пастереллёза, вызванного *M. haemolytica*, по многочисленным литературным данным стоит признать микоплазмы и бактериальные агенты, патогенное воздействие которых на респираторную систему является давно установленной и доказанной. По мнению G.E. Jones с соавт. наибольшее значение среди этих возбудителей имеют *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, *M. mycoides subsp. capri*, *M. bovis*, *M. ovipneumoniae* и *M. dispar*. Большинство из представителей микоплазм способны к провоцированию легочных поражений, как самостоятельная единица, так и в комплексе с *M. haemolytica* и *P. multocida* [55, 99, 148]. Z. Jian с соавт. отмечает, что среди бактериальных агентов при развитии заболевания достаточное влияние имеет *Bordetella parapertussis*, наличие которой в организме у лабораторных животных способствовало увеличению восприимчивости к *M. haemolytica* [98, 131].

В качестве предрасполагающих факторов некоторые авторы дополнительно отмечают дефицит селена, наличие в употребляемых кормах микотоксинов, обструкцию дыхательных путей. Также исследователи отмечают явное влияние на

развитие инфекционной патологии ассоциированного паразитарного заболевания, благодаря способности нематод к иммуносупрессии [44, 120, 130, 135, 175].

2.1.5. Патогенез

Описанный патогенез пастереллёза, вызванного *Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella haemolytica*), на данный момент является достаточно спорным вопросом среди специалистов ввиду многофакторного характера заболевания, влекущего за собой несогласованность результатов, полученных экспериментальным путем. Тем не менее, по данным J.G. Vestweber и соавт., а также ряда других учёных считается, что бактериальный агент *Mannheimia haemolytica* не способен самостоятельно спровоцировать инфекционную патологию без наличия предрасполагающих факторов, что само по себе объясняет сложность воспроизведения экспериментальной инфекции [73, 123, 166].

R.C. Cutlip и др. в своих трудах отмечают, что момент начала развития патологического процесса связан с активацией резидентных микроорганизмов *Mannheimia haemolytica*, локализующихся на поверхности, как верхних дыхательных путей, так и на поверхности эпителиальных клеток легких и бронхов [56, 58, 65]. Данное мнение подтверждает G.J. Jakab, который в одной из своих работ акцентирует внимание на том, что инфекционный процесс может быть вызван при наличии двух условий, первое из которых – это необходимость наличия самого возбудителя в организме, второе – это наличие предрасполагающих факторов различного характера [92].

R.F. Slocombe с соавт. определили, что механизм развития болезни для всех видов восприимчивых животных имеет одинаковые черты. По данным, предоставляемым авторами, возбудители, локализующиеся на слизистых оболочках верхнего отдела респираторного аппарата, по нисходящим путям проникают в вентральные бронхи, бронхиолы и альвеолы. В виду того, что возбудитель вырабатывает фермент – нейраминидазу, выделяемая мокрота не способна к полноценному выполнению своей защитной функции [138]. T.C. Jones и др. сообщают, что выделяемые микроорганизмом эндотоксины в инфицированных долях легких

вызывают обширные внутрисосудистые тромбозы легочных вен, капилляров и лимфатических сосудов. Данные сосудистые нарушения, в конечном счете, приводят к фокальному ишемическому некрозу легочной паренхиматозной ткани с одновременным проявлением фибринозного воспаления [112].

R.W.Hilwig с соавт. установили, что тяжесть инфекционного процесса зависит от скорости и степени бактериальной пролиферации и количества выделенного лейкотоксина [70, 90].

W.D. Yates и др., а также R.F. Slocombe с соавт. установили, что рассматриваемая нами инфекция протекает в форме острого легочного заболевания с проявлением фибринозно-долевой пневмонии, фибринозной бронхопневмонии или фибринозного плеврита. Данное состояние характеризуется отеками и отложением фибрина в легких и на плевре. Помимо фибрина в альвеолах, бронхиолах, бронхах и на поверхности плевры, возможно скопление крови и экссудата, а также наличие дегенеративных нейтрофилов и макрофагов [138, 168, 174].

Наиболее подробно патогенез манхеймия-инфекции описал R.G. Thomson. Так, по его сообщению, при воздействии предрасполагающего фактора у животного через несколько часов начинаются воспалительные процессы в легких, приводящие в итоге к обширному некрозу. Данный нюанс связан с активным действием лейкотоксина и липополисахаридов, которые способствуют снижению функциональности лейкоцитов, влияют на разрушение макрофагов и нейтрофилов. В междольковых перегородках легких наблюдается тромбоз и вздутие, связанные со скоплением фибрина и лейкоцитов. Некроз распространяется через междольковые перегородки к соседним долям [149]. S. Jeyaseelan с соавт. доказали, что сам лейкотоксин не имеет прямого влияния на эпителиальные клетки, тем не менее, он выступает в качестве катализатора патологического процесса [97].

L.O. Whiteley и др. в своих работах указывают на то, что первичные вирусные или бактериальные агенты угнетают антимикробный барьер бета-дефензинов серозных и слизистых выделений дыхательных путей, тем самым, способствуя активизации *M. haemolytica* и колонизации возбудителем слизистых оболочек бронхов и легких. Разрушение нейтрофилов высвобождает такие ферменты, как

эластазу и кислые гидролазы, а также цитокины. Эндотоксины вызывают тромбоз легочных вен, капилляров и лимфатических сосудов, что в конечном итоге приводит к ишемическому некрозу легочной паренхимы и тяжелой воспалительной реакции. Тяжесть течения заболевания, в первую очередь, зависит от вирулентных свойств возбудителя [138, 173].

2.1.6. Клинико-морфологическое проявление пастереллёза крупного и мелкого рогатого скота, вызванного *Mannheimia haemolytica*

В соответствии с данными, предоставляемыми J.G. Vestweber с соавт., проявление клинических признаков заболевания любой возрастной группы восприимчивых животных, в первую очередь, стоит рассматривать как следствие скомпрометированного влияния на защитные механизмы организма стресс-фактора и/или инфекционного заболевания с возбудителем *Mannheimia haemolytica*. Авторы отметили, что, возбудитель, находясь в организме восприимчивого животного, зачастую не ведет к проявлению клинических признаков заболевания до возникновения оптимальных для него условий. Ввиду того, что в качестве важного этиологического фактора манхеймиоза могут выступать вирусные и иные бактериальные агенты, имеющие собственные формы проявления болезни, постановка окончательного диагноза затруднена и требует большего времени, что влияет на своевременность проведения лечебных мероприятий. Развитие и проявление клинических признаков для всех видов восприимчивых животных имеют весьма схожие черты [166].

О.М. Radostits с соавт. зафиксировали, что активация возбудителя у взрослого скота чаще всего происходит при воздействии транспортного стресс-фактора, ввиду чего данное заболевание в ряде стран ассоциируется с транспортной лихорадкой. Клиническое проявление заболевания у крупного рогатого скота, как правило, имеет три фазы. Первая фаза подразумевает появление острой лихорадки с колебанием температуры тела на 1-2 °С от физиологической нормы. Вторая фаза сопровождается проявлением дыхательной недостаточности в следствие фибринозной бронхопневмонии, фибринозного плеврита. Развитие клини-

ческих признаков легочной недостаточности у взрослого поголовья развивается в течение 10-14 суток после активизации возбудителя, но встречаются случаи, когда период развития клинических признаков сокращается до нескольких дней. Третья фаза терминальная, при которой гибель животного наступает ввиду септических процессов. При острых вспышках заболевания среди взрослого поголовья клиническое течение продолжается в течение 2-3 дней, приводит к летальному исходу, либо к хронической форме [134].

При проведении экспериментальной инфекции R.W.Hilwig и др. обнаружили, что у молодняка крупного рогатого скота наблюдается лихорадка с повышением температуры тела до 41°C, значительная потеря веса, кашель, учащение дыхания, слизистые выделения из носа [90].

По данным MW. Odendaal и др. иногда гибель животного наступает спустя 24-48 часов после воздействия стресс фактора [75, 115, 125]. J.F. Timoney и др. сообщают, что высокая смертность среди телят объясняется несколькими причинами: во-первых, низкий иммунный статус в постнатальный период, а также в следствие первичной болезни; во-вторых, активные свойства токсинов возбудителя для молодняка более пагубны. Гибель животного наступает еще до окончательного развития легочных поражений. Данный момент стоит ассоциировать с неожиданно быстрым падежом молодняка на неблагополучной по заболеванию территории. После гибели ослабленного молодняка наступает некоторое затишье с последующей более массовой волной падежа животных всех возрастных групп [150,169].

D.L. Dungworth, а также A. Lopez при описании особенностей проявления заболевания, сообщают, что к общим клиническим признакам для всех возрастных категорий крупного рогатого скота можно отнести снижение аппетита, резкое снижение массы тела, малоподвижность, частое неглубокое дыхание, обильные истечения из глаз и носовых ходов, кашель, усиливающийся при физической нагрузке, одышка [70, 112]. W.D. Yates установил, что при аускультации лёгких больных животных прослушиваются усиленные везикулярные и бронхиальные влажные хрипы, постепенно переходящие в сухие. Зачастую у молодняка отме-

чаются признаки диареи. Легочные поражения характеризуются обширной инфильтрацией нейтрофилов и экссудацией фибрина в альвеолы и дыхательные пути. Бронхи имеют неповрежденную стенку, за исключением случаев некрозов и десквамации эпителиальных клеток. Отмечается возможность скопления в бронхах лейкоцитов и фибрина. Альвеолы – отекшие, содержат фибрин, иногда сгустки крови. Лимфатические узлы опухшие [174].

N.J.L. Gilmour, а также K.A. Brogden с соавт. установили, что для мелкого рогатого скота катализатором заболевания является физическая нагрузка или появление неблагоприятных условий содержания и нарушение кормления. Среди молодняка рогатого скота отмечают внезапную смертность, что обычно возникает после отъема в осенне-зимний период. У мелкого рогатого скота заболевание развивается в септической форме. Клиническое проявление заболевания у овец и коз имеет схожие черты с признаками инфекции у крупного рогатого скота, описанными ранее. Исключением является срок наступления летального исхода в тяжелых случаях, который составляет 12-24 часа [55, 82].

P. Dewani с соавт. установили, что наиболее часто летальный исход наблюдается среди молодого поголовья МРС, без развития клинических признаков. У овец и коз имеется маститная форма заболевания. При этом патологический процесс чаще всего охватывает одну сторону молочной железы, в продолжение чего возникают некротические процессы, что вызывает ряд общих системных поражений – лихорадка, анорексия, депрессия, снижение аппетита, малоподвижность [68, 79].

В работах N.J.L. Gilmour и др., а также A.C. Midwinter, с соавт. сообщается, что форма заболевания, при которой поражаются молочная железа, имеет синонимичное название – синее вымя [83, 117, 167].

T. Suzuki с соавт. при описании патологоанатомического исследования крупного рогатого скота при мангейм-инфекции отмечают петехиальные геморрагии подкожной соединительной ткани, перикардит, геморрагическое поражение желудочков сердца. Поражения желудочно-кишечного тракта складывается из гиперемии слизистых оболочек, петехиальных или объёмных геморрагических

поражений сычуга. Авторы отмечают, что степень повреждений зависит от продолжительности течения заболевания и вирулентности возбудителя [146].

LF. Taylor, а также E. Redondo с соавт. обнаружили, что при манхеймийской инфекции крупного рогатого скота наблюдается обширная инфильтрация дыхательных путей и альвеол нейтрофилами. Септическая форма заболевания приводит к острой гепатоспленомегалии. Острая форма заболевания подразумевает серозный, геморрагический и/или фибринозный плеврит, возможно с выпотом экссудата. Поверхность легкого принимает мраморный вид ввиду одновременных некротических изменений и кровоизлияний [135,147].

В соответствии с данными предоставленными T.R. Ames и соавт. при пастереллёзе у мелкого рогатого скота, вызванного *M. haemolytica*, наблюдаются катарально-геморрагическое воспаление сычуга и серозно-фибринозный плеврит и перикардит. Легочные поражения описываются чаще всего как долевая фибринозная бронхопневмония с проявлением фибринозного плеврита. При воспалительном процессе доминирующим явлением становится образование фибринозного экссудата в альвеолах легких. Воспаление сопровождается интерстициальным отеком, при этом легочная ткань на срезе приобретает мраморный вид. Поражение всегда двустороннее с краевентральным направлением развития [45].

B. Schiefer с соавт. сообщают, что апикальные и сердечные доли являются наиболее пораженной зоной, а также достаточно интенсивно поражается диафрагмальные доли. Поражённая зона становится легко отличимой от здоровой благодаря приобретению темно-красного цвета. Междольковые перегородки растянуты и приобретают желтоватый оттенок благодаря выделению транссудата и/или фибрина. В пораженных областях легких развиваются множественные участки коагуляционного некроза. Средостенные и бронхиальные лимфатические узлы увеличены в размерах. В трахеях и бронхах у животных достаточно часто можно обнаружить пенистую жидкость в больших объемах [137].

M. Haritani с соавт. зафиксировали при гистологическом исследовании диффузные капиллярные заторы, интерстициальный или альвеолярный отек в комплексе с сосудистым тромбозом капилляров, мелких кровеносных сосудов и

легочных лимфатических сосудов. Альвеолярный некроз часто можно обнаружить на всей пораженной зоне с большим количеством фибринозного экссудата и воспалительных клеток внутри альвеол. Возбудителя, находящегося в фазе активного размножения, обнаруживают в непосредственной близости от некротических участков легочной ткани. Экссудат, состоящий из фибрина и отмерших клеток, часто наблюдается внутри бронхов и бронхиол. Возбудителя заболевания *M. haemolytica* можно обнаружить в некротических стенках альвеол, фибрине, серозном экссудате [88].

К.А. Brogden с соавт. сообщают, что результаты проведения патологоанатомического исследований трупов животных, павших от *M. haemolytica* как в естественных условиях, так и при экспериментальном заражении овец, коз и крупного рогатого скота имеют схожие проявления. Инфекция у мелкого рогатого скота может проявляться в виде острой геморрагической либо в фибринозно-долевой бронхопневмонии с явлениями образования фибринозных спаек с грудной клеткой. Количество серозной или серозно-фибринозной жидкости в перикардальной, плевральной и перитональной полостях достигает большого объема. У МРС также проявляются двусторонние краниовентральные поражения в частности в апикальных и сердечных областях с образованием фибринозных спаек покрывающую большую часть пораженных участков легких. Обширные и широкие распространения тромбозов в легочных сосудах наблюдаются на всей площади пораженной зоны, при которых образование тромбов ограничивается на мелких кровеносных сосудах, капиллярах, и лимфатической системе легких. Появление большого количества тромбов можно объяснить сильнодействующим прокоагуляционным эффектом эндотоксинов возбудителя [54].

2.2. Лабораторная диагностика

Проведение лабораторной диагностики в России регламентируется «Методическими указаниями по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц» № 22-7/82 от 20.08.1992 г. В соответствии с указаниями использование данных об эпизоотическом благополучии хозяйства и региона, клинических при-

знаков и патологоанатомических изменений, вызванных возбудителем, позволяет поставить предположительный диагноз. Окончательный диагноз устанавливается при проведении лабораторной диагностики [27].

Отсутствие в указаниях серологических и молекулярно-генетических методов постановки диагноза можно объяснить тем, что в России нет официально зарегистрированных средств для данных методов. Тем не менее, на зарубежном рынке можно приобрести наборы для ИФА диагностики, в частности Mannheimia haemolytica ELISA KIT BioX Бельгийского производства. Е.В. Пешкова под руководством А.В. Кононова в своей работе описывает разработку отечественного ИФА набора для серодиагностики пастереллёза, вызванного Mannheimia haemolytica, в условиях ФГБУ «ВНИИЗЖ» и приводит положительные результаты определения чувствительности и специфичности в сравнении с Бельгийским набором [34].

Среди иностранных коммерческих средств для диагностики методом ПЦР существует набор для детекции Pasteurella multocida и Mannheimia haemolytica методом ПЦР LSI VetMAX™ Triplex Pasteurella multocida & Mannheimia haemolytica.

В России А.В. Щербаков с соавт. в 2005 году описали положительный опыт использования метода полимеразной цепной реакции для обнаружения Mannheimia haemolytica [42].

2.3. Лечебные мероприятия при пастереллёзе вызванном Mannheimia haemolytica

В соответствии с данными Европейского комитета по определению антибиотикочувствительности (Eucast) лечебная тактика при заболевании основана на предотвращении влияния первичного стресс-фактора и использования средств неспецифического этиотропного лечения – антибактериальных препаратов. Перед началом курса лечения необходимым является проведение подбора наиболее эффективных антибактериальных препаратов. В соответствии с научными данными наиболее эффективными антибиотиками для лечения данного заболевания являются препараты различных групп. Так, среди пенициллинов высокой терапевти-

ческой эффективностью обладает амоксиклав; среди фторхинолонов – данофлоксацин, марбофлоксацин; среди группы линкозамидов – линкомицин; среди тетрациклинов – окситетрациклин; аминогликозидов – спектиномицин; макролидов – тилмикозин, тилозин; цефалоспоринов – цефазолин, цефалексин; среди фениколов – флорфеникол. В качестве комплексных препаратов целесообразнее использовать препараты: интрамицин, квинокол, кобактан, неопен, пенбекс, спектам, энроксил. В ряде зарубежных стран практикуется применение антибактериальных препаратов вновь вводимым в стадо животных как превентивная мера, позволяющая достичь снижения заболеваемости и падежа [19, 89, 100, 105, 157, 171].

2.4. Специфическая профилактика мангеймий-инфекции крупного и мелкого рогатого скота

Согласно имеющимся научным данным при разработке средств специфической профилактики мангеймий-инфекции является возможным использование различных компонентов бактериальной клетки возбудителя. Так S. Srinand и др. при изучении эффективности применения биопрепаратов против пастереллёза, спровоцированного *M. haemolytica*, выполненных в различных вариациях, в частности в виде бактерий-анатоксин вакцины, вакцины выполненной из лейкотоксина, живой вакцины и вакцины, выполненной из экстракта белков внешней мембраны, доказали, что наилучший иммунный ответ достигается при использовании бактерий-анатоксина [142]. При этом механизмы формирования иммунитета при вакцинации отличаются у разных видов животных, так E.F. Cassirer с соавт. установил, что у овец на введение антигена *M. haemolytica* титры антител были выше, чем титры у крупного рогатого скота [59]. A. Mehmet с соавт. подчёркивает возможность формирования стойкого иммунитета у животных при использовании цельноклеточного антигена *Mannheimia haemolytica* [116].

В настоящее время, в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств для ветеринарного применения для профилактики пастереллёза крупного и мелкого рогатого скота, вызванного *Mannheimia haemolytica*, на тер-

ритории Российской Федерации используют ряд вакцин, как отечественного, так и импортного производства, в частности:

1) Вакцина против пастереллеза крупного рогатого скота инактивированная эмульгированная «Пастервакарм». Согласно утверждённой инструкции вакцина изготовлена из штаммов *Pasteurella multocida* № 1231 (серогруппа А), *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* КМИЭВ-В158, инактивированных формалином до концентрации формальдегидом (0,3 %) и заключенных в водно-масляную эмульсию. Вакцина вызывает формирование иммунитета на 10-14 день после вакцинации и сохраняется в течение 6 месяцев. У молодняка колостральный иммунитет развивается после приёма молозива молока и сохраняется в течение 20 дней [16, 21].

2) Вакцина против пастереллеза жвачных животных инактивированная эмульгированная "Пульмовак". Согласно инструкции, вакцина содержит инактивированные микробные клетки пастерелл *Pasteurella multocida* серогруппы В, *Pasteurella multocida* серогруппы А, *Pasteurella multocida* серогруппы D и *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* серотипа А:1 - не менее 3×10^9 КОЕ каждого, с добавлением в качестве консерванта формальдегида (0,3%) и масляного адъюванта Монтанид ISA 70 (SEPPIC). Препарат вызывает формирование иммунитета у крупного рогатого скота и овец против пастереллёзов через 2 недели после вакцинации. Продолжительность сохранности иммунитета составляет не менее 12 месяцев [17].

3) Вакцина для профилактики клостридиозов и пастереллеза у крупного рогатого скота и овец инактивированная «Бар Вак® 10». Согласно инструкции вакцина содержит инактивированные культуры бактерий и анатоксины: *Clostridium chauvoei* (штамм Оклахома), *Clostridium septicum* (штамм 9807), *Clostridium novyi* (штамм 2879), *Clostridium sordellii* (штамм 831), *Clostridium perfringens* тип С (штамм 883), *Clostridium perfringens* тип D (штамм 1635), *Mannheimia haemolytica* тип 1 (штамм 1148), *Pasteurella multocida* тип А (штамм 1062) с добавлением не более 0,39 мл раствора Ретиген® в качестве адъюванта, не более 0,120 мл 7,5% раствора фенола, 0,5 мг пеногасителя и 10N раствора гидроксидов

сида натрия (до 2 мл). Препарат вызывает формирование иммунного ответа у крупного рогатого скота и овец через 21 день после двукратной вакцинации продолжительностью не менее 12 месяцев [43].

4) Вакцина для профилактики клостридиозов и пастереллеза крупного рогатого скота инактивированная «ВанШотУльтра 8». Согласно инструкции, препарат содержит антиген *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (шт. NL1009), инактивированный формалином и антигены *Clostridium chauvoei* (шт. F), *Cl. septicum* (шт. A), *Cl. haemolyticum* (шт. IRP135), *Cl. novyi* (шт. 8296), *Cl. sordellii* (шт. 5918), *Cl. perfringens* тип C (шт. PC8) и *Cl. perfringens* тип D (шт. 317), инактивированные формалином с добавлением сапонина, сульфата калия и алюминия и воды для инъекций. Формирование иммунитета наступает спустя 3 недели после повторной вакцинации, сохранностью на 12 месяцев [14].

5) Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза крупного рогатого скота «КОМБОВАК-Р». Согласно инструкции, препарат состоит из инактивированных формалином 4 производственных штаммов вирусов: инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вируса диареи, респираторно-синцитиальный и вирусной диареи крупного рогатого скота, пастерелл *Pasteurella multocida* (серовары А, В, Д), *Mannheimia haemolytica* с адъювантом - гидроокисью алюминия. Формирование иммунитета наступает спустя 14 дней после второй вакцинации и сохраняется в течение 8 месяцев [15].

6) Вакцина против парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллеза крупного рогатого скота, инактивированная «Бовилис® Бовипаст RSP». Согласно инструкции вакцина изготовлена из культуральной жидкости перевиваемой линии клеток MDBK, инфицированных вирусами парагриппа-3 (штамм SF-4 Reisinger) и респираторно-синцитиальным (штамм EV 908), и бактерий *Pasteurella haemolytica* (штамм M4/1 серотипы А1 и А6), инактивированных формальдегидом, с добавлением адъювантов (гидроксид алюминия 37,5 мг, сапонин — 0,625 мг), стабилизатора (натрия тимерфонат — 0,05 мг), пеногасителя (байсилон EBZ — 0,0625 мг), фосфатно-буферного раствора до 5 мл. Формирова-

ние иммунитета наступает спустя 14 дней после двукратной вакцинации. Продолжительность иммунитета сохраняется в течение всего 6 недель против *Mannheimia haemolytica* [12].

2.5. Заключение

В соответствии с действующими на территории Российской Федерации методическими указаниями и иными регламентами бактерии вида *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* вызывают пастереллёз животных, в т.ч. птиц, что не в полной мере соответствует действительности. Манхемия-инфекция имеет существенные отличия от пастереллёза, вызванного *P. multocida*, в существенных особенностях возбудителя, что стало причиной его реклассификации в отдельный род, и клинико-эпизоотологических особенностях проявления заболевания, вызываемого *M. haemolytica*.

Бактерия *Mannheimia haemolytica* ранее изучалась российскими учёными как *Pasteurella haemolytica*, но структурированных данных о данном возбудителе и вызываемом им заболевании не было. Поэтому возникает необходимость подробного изучения особенностей биологического агента, а также эпизоотологических и клинико-морфологических проявлений заболевания, вызываемого данным возбудителем.

Вакцинопрофилактика манхеймиоза в настоящее время не удовлетворяет эпизоотическим вызовам. В связи с этим актуальным является научное обоснование и разработка эффективной вакцины против данной инфекционной болезни, технологии ее изготовления, промышленного производства и методов контроля.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Материалы

Научная работа была выполнена в период 2014-2017 гг. на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» в лаборатории микробиологии с музеем типовых культур.

Изучение эпизоотической ситуации, клинические обследования животных, патологоанатомические исследования трупов павших животных, взятие материала для лабораторных исследований проводили на сельскохозяйственных предприятиях Московской, Тульской, Смоленской, Владимирской, Калужской, Тверской, Новгородской, Нижегородской, Белгородской, Орловской, Рязанской, Курской, Кировской, Тамбовской, Челябинской, Пензенской областей, Ставропольского и Краснодарского краев, Республики Мордовия. Проведение бактериологического исследования с последующим изучением морфологических, тинкториальных, культуральных, биологических и серологических свойств проводили в лаборатории микробиологии с музеем типовых культур ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» (ФГБНУ ВИЭВ) с опытной базой на острове Лисий Вышневолоцкого района Тверской области. Молекулярно-генетические исследования проводили на базе ФГБНУ ВИЭВ. Производство экспериментальных серий биопрепарата проводили в лабораторных условиях ФГБНУ ВИЭВ и производственных условиях ООО «Ветбиохим». Испытание эффективности, безвредности, антигенной активности биопрепарата проводили в скотоводческих предприятиях СПА «Колхоз имени Ворошилова» Новоалександровского района Ставропольского края; ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» Сергиево-Посадского района Московской области; ООО «Колхоз Гжельский» Московской области; вивария Вышневолоцкого филиала ФГБНУ ВИЭВ.

В работе были использованы коллекционные, музейные, производственные штаммы и полевые изоляты бактерий семейства Pasteurellaceae и других видов бактерий, а также элективные, дифференциально-диагностические питательные

среды, химические реактивы, лабораторная посуда и оборудование, животные, а также эпизоотологические, бактериологические, серологические, статистические методы исследований, методы биотехнологии, молекулярной диагностики и другие методы исследований.

Штаммы: производственные: *Mannheimia haemolytica* – 169, КМИЭВ-B158; полевые: *Pasteurella multocida* subsp. *Multocida* – Рm-КАВ-1, ИВ1 (Челябинская область), Рm-ЛАИ-1 (Республика Мордовия), Рm-ЛАИ-4 (Республика Мордовия), Нов-11 (Новгородская область), Правда-5, (Московская область), Малахово, Скопино (Рязанская область), Дб-16, Дб-18, (Ставропольский край), Городецк (Нижегородская область); *Pasteurella multocida* subsp. *Septica* – НЛК (Кировская область), КБ (Белгородская область), Рm-ЛАИ-7 (Ставропольский край); *Pasteurella multocida* subsp. *Gallicida* – Орл.-23 (Московская область), Р40 (Калужская область); *Pasteurella aerogenes* – Ключ-14 (Республика Мордовия); *Mannheimia haemolytica* – КАВ-1 (выделен от крупного рогатого скота в Белгородской области), АМ9 (выделен от крупного и мелкого рогатого скота в Челябинской области), 219 (выделен от крупного рогатого скота в республике Мордовия), 207 (выделен от крупного рогатого скота в республике Мордовия), 217 (выделен от крупного и мелкого рогатого скота в Краснодарском Крае); *Bibersteinia trehalosi* – Тверь-5 (Тверская область); *Mannheimia glucosida* – Мг-МО (Московская область).

В качестве контрольных штаммов использовались эталонные культуры бактерий: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* 6633, *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella oxytoca* 8724, *Proteus mirabilis* 35659, *Salmonella enterica* sv. *enteritidis* 13076, *Shigella sonnei* 25931, *Mannheimia haemolytica* ATCC 33396, полученные из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЭВ.

Во время выполнения работы культуры хранились и поддерживались нами в лиофилизированном виде в запаянных ампулах и в нативной форме в полужидком МПА (0,25%-ном) при температурном режиме 2-8 °С.

Питательные среды: При проведении комплексного микробиологического исследования были использованы: желатиновая среда, модифицированный эскулиновый агар, эскулиновый бульон, среда Кларка, нитратный бульон, агар с мо-

чевиной 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 Андреде, триптон соевый бульон, триптон соевый агар, триптон-цистиновый агар, бульон Хоттингера производства ООО «Himedia» (Индия) и фирмы «Oxoid» (Великобритания).

Диагностические тест системы: Для изучения биохимических свойств, а также для родовой и видовой идентификации выделенных изолятов бактерий семейства Pasteurellaceae были 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 биохимических 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 ООО «Himedia».

Реактивы и лабораторная посуда: Для выполнения задач были использованы набор для окраски по Граму (фуксин основной, генцианвиолет, раствор Люголя, масло иммерсионное), метиленовый синий, нитрат калия, вода дистиллированная, деминерализованная вода, хлористый натрий, двуосновной фосфорнокислый натрий, пептон, адъювант Montanide ISA 70, 40 %-ный раствор глюкозы, глицерин, Твин-20, бычий сывороточный альбумин, 8-оксихинолин сернокислый, хлороформ, фосфатно-буферный раствор, сульфат аммония, трис-HCl буфер, хлорид магния, Taq-полимераза, диски для определения чувствительности к антимикробным препаратам, полиэтиленгликоль-6000, гидроокись алюминия, мертиолят, ПЦР-буфер, олигонуклеотиды для ПЦР, уранил-ацетат, транспортные системы (свабы); пробирки стеклянные лабораторные, пипетки стеклянные лабораторные разного объема, пипетки стерильные одноразовые пластиковые, чашки Пет-

ри, пробирки «Eppendorf», ампулы стеклянные, ватно-марлевые фильтры, колбы мерные, матрасы лабораторные стеклянные, 6-литровые бутылки и другие стеклянные стерильные емкости разного объема, бактериальные петли, шприцы одноразовые стерильные инсулиновые, шприцы одноразовые стерильные объемом 1,0 и 2,0 см³, пипетки мерные разного объема, флаконы емкостью 50 и 100 см³, бутылки объемом не менее 6 литров, стекла покровные, стекла предметные и т.д.

Лабораторное и промышленное оборудование: Исследования осуществляли с использованием холодильника Indesit, термостата с возможностью регулирования температуры Sanyo MIR-262, микроскопа Jeneval, автоклава ВК-75, весов электронных AND GX-200, автоматических пипеток-дозаторов одно- и восьмиканальными объемами 10-200 мкл Biohit mLINE, pH-метра selecta ph-2005 ph meter, набора оптических стандартов мутности ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора, стандартов МакФарленда, центрифуги Treeewe 6LR, стерилизующих фильтров СФ-300, аппарата для лиофилизации christ epsilon 1-4, системы для взятия крови. Для изготовления промышленных образцов биопрепарата было использовано следующее оборудование: аппарат для получения деионизированной воды: УЦ-10 с установкой трехкорпусной для получения дистиллированной или апирогенной воды, тип 2600-00; сборник для конденсата и деионизированной воды стальной эмалированный СЭН-6; автоклав DGM-80, ГПС 560; парогенератор ПЭЭ-15; сушильный шкаф ШСС-250; термостат Бруве-10 (ГДР), ТЭС-1; холодильная камера КХМ 2 (40С); реактор для смешивания жидкостей объем 375,0 (130,0) л; ламинарный бокс ELB 2472; проточный насос полупогружной Lutz 2B Varjo; полуавтомат розлива ПРП-Винс-Мед; водяная баня ВР-2; стерилизатор электрический Э-22; кримперная машинка для алюминиевых колпачков «VWR» VZ 20 mm; этикеточный принтер Zebra Technologies.

Животные: Для лабораторных опытов и производственных испытаний в работе были использованы SPF белые мыши массой 16-18 г. – 90 голов., белые мыши линии SCIDBEIGE – 18 шт., морские свинки массой 350-450 г. - 121 голов., 1 баран-донор, крупный рогатый скот - 168 голов., мелкий рогатый скот - 78 голов разных возрастных групп.

3.2. Методы

3.2.1. Микробиологические

Изучение эпизоотической ситуации. Изучение эпизоотической ситуации по пастереллёзу животных, вызванному бактериями вида *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica*, проводили с использованием анализа отчетности противозооотического отдела Департамента ветеринарии МСХ РФ, а также основываясь на собственных результатах изучения случаев заболеваемости и бактериологических исследований патологического материала из животноводческих предприятий различных регионов страны.

Микробиологическое исследование. Микробиологические исследования для выделения из патологического и клинического материала бактерий рода *Pasteurella* и *Mannheimia* были проведены согласно действующим на территории Российской Федерации методическим указаниям по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц № 22-7/82 от 20.08.1992 г.

Микроскопирование. Изучение морфологических и тинкториальных свойств микроорганизмов проводилось посредством общепринятого окрашивания мазков методом Грама, Леффлера, Романовского-Гимза и последующим микроскопированием их.

Изучение сахаролитических и протеолитических свойств. Изучение сахаролитических и протеолитических свойств манхемий проводили с использованием углеводов и бромкрезолового пурпурного бульона в качестве индикатора образования кислоты, а также коммерческих наборов для биохимической идентификации бактерий в соответствии с инструкцией.

Проведение реакции непрямой гемагглютинации (ИНА test). Реакция используется для определения серотиповой принадлежности эпизоотических культур *Mannheimia haemolytica* с использованием 96-ти луночных полистероловых планшетов. Принцип проведения теста заключается в следующем.

- 1) Во все лунки планшета (A1-H12) вносится 50 мкл PBS;
- 2) В лунки колонки 1 вносится антисыворотка, полученная от животных гипериммунизированных определённым штаммом в объёме 50 мкл;

- 3) Проводиться двукратное титрование содержимого лунок колонок 1-11;
- 4) Для достижения равного объёма смеси во всех лунках из лунок колонки 11 удаляется 50 мкл смеси. Таким образом все лунки должны содержать 50 мкл смеси;
- 5) Во все лунки планшета вносится по 50 мкл сенсibilизированных антигеном эритроцитов;
- 6) Инкубирование планшетов проходит при температурном режиме 37 °С в течение 1 часа, без встряхивания;
- 7) В вертикальный ряд 12 внесено 50 мкл отрицательной сыворотки.
- 8) Учёт результата проводится благодаря визуальной оценке полноты агглютинации. Положительной результат признавали в случае агглютинации эритроцитов, имеющих вид перевернутого «зонтика», а отрицательной при оседании эритроцитов на дне в виде равномерного диска. За титр сыворотки принимали последнее её разведение, в котором наблюдалась гемагглютинация.

Определение патогенных и вирулентных свойств. Определение патогенных и вирулентных свойств изолятов манхемий проводили с использованием лабораторных животных, относящихся к группе свободных от патогенной микрофлоры (SPF), а также линии иммунодефицитных мышей SCIDBEIGE в различных опытах.

Первый опыт по определению патогенных свойств проводили с использованием стандартной методики подкожного инъектирования живой культуры возбудителя. Ввиду низкой патогенности изучаемого бактериального агента для лабораторных животных его концентрация была увеличена до 5 млрд. мкр. кл. в 1 см³ вместо стандартного 1 млрд. Период наблюдения за животными составил 7 дней.

Во втором опыте по определению патогенности использовали линии иммунодефицитных мышей (SCIDBEIGE). Заражение животных проводили интраназально, для этого использовали 0,2 см³ суспензии, содержащей 3,5x10⁹ мкр. кл. 24-часовой культуры возбудителя. На каждый штамм использовали по 2 белых мыши. Наблюдение за животными вели в течение 7 дней или до момента гибели.

В третьем опыте для определения патогенности культур *M. haemolytica* в качестве биологической модели использовали белых мышей массой 16-18 г. Для каждой культуры изучение патогенности проводили с использованием четырёх белых мышей, заражение которых проводили 18-24 часовой бульонной культурой манheimий или суспензией бактериальных клеток на физиологическом растворе с агаровых сред концентрацией $3,5 \times 10^9$ мкр. кл. Ввиду низкой патогенности данного возбудителя для белых мышей при интраназальном методе введения был разработан метод предварительной иммуносупрессии с использованием дексаметазона. Для этого восьми белым мышам за 120 часов до инфицирования внутримышечно вводили 0,01 мл 0,4 %-ного 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 четырём из восьми мышей интраназально вводили суспензию микроорганизмов в объёме 0,2 см³, оставшиеся четыре мыши использовались в качестве контроля. При наличии патогенных свойств у возбудителя гибель лабораторных мышей должна наступить в течение 7 суток с момента инфицирования.

Для определения вирулентности исследуемых штаммов проводилась аналогичная работа, что и при определении патогенных свойств, т.е. с использованием мышей подвергнувшихся предварительной иммуносупрессии дексаметазоном, но на увеличенном количестве лабораторных животных и различными концентрациями инфицирующей суспензии в десятикратном разведении, т.е. 4 мыши инфицировались при интраназальном заражении 0,2 мл бактериальной суспензии с концентрацией 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 мкр. кл. см³. Определение вирулентности проводилось только для штаммов проявивших патогенные свойства в опытах, проведённых ранее. В качестве контроля использовались 4 мыши. С целью определения истинной концентрации бактериальных клеток в суспензии производили количественное определение живых клеток чашечным методом с использованием трёх последних разведений. Затем подсчитывали среднее микробное число клеток в используемом объёме суспензии с последующим пересчётом на 1 см³.

Статистическая обработка данных для определения значения показателя LD₅₀ проводилась с использованием программного обеспечения BioStat 2009.

3.2.2. Биотехнологические

Лиофилизация изолятов *Mannheimia haemolytica*. Лиофилизация культур микроорганизмов *M. haemolytica* проводили согласно технологии подробно описанной стандарте организации «СТО 00496165-0003-2017 Производственные и контрольные штаммы *Mannheimia haemolytica* (метод изготовления и контроля посевных материалов)» [приложение 5].

Получение дефибринированной крови для производства питательных сред. Получение дефибринированной крови для производства питательных сред осуществляли от баранов-доноров вивария ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» и бычков-доноров вивария Вышневолоцкого филиала ФГНБУ ВИЭВ с опытной базой о. Лисий. Получение дефибринированной крови проводили согласно ГОСТ 31746-2012 (ISO 6888-1:1999, ISO 6888-2:1999, ISO 6888-3:2003) Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*.

Накопление бактериальной массы. Накопление бактериальной массы культур *M. haemolytica* проводили с использованием метода глубинного культивирования в бутылках по общепринятой методике, а также с использованием промышленного реактора согласно технологическому регламенту. С целью подбора наиболее подходящей питательной среды, обеспечивающей максимальное накопление бактериальной массы, а также для определения экономической целесообразности её использования применяли различные коммерческие питательные бульоны: Хоттингера, эугоник, сердечно-мозговой, мясо-пептонный, триптон-соевый производства «HiMedia» и «Oxoid». Приготовление питательных сред было проведено в полном соответствии с инструкцией производителя.

Инактивация бактериальных антигенов. Осуществляли путём добавления 0,3 % формалина к общему объёму бульонной культуры. Продолжительность инактивации была равна 3 суткам при температуре +37 °C.

Концентрирование бактериальной массы. Концентрирование бактериальной массы экспериментальных серий препарата было произведено методом отстаивания и методом центрифугирования. Период отстаивания в бутылках был равен 30-ти дням. После чего в стерильных условиях проводили декантирование двух третей объёма бутылки. Концентрирование бактериального антигена методом центрифугирования было произведено с использованием центрифужной установки Тгеewe 6LR в течение 30 минут при 4000 оборотах при постоянном поддержании температуры +4 °C. После окончания цикла центрифугирования в стерильном боксе производили декантирование 90 % объёма супернатанта, находящихся в центрифужных стаканах, остальные 10 % были перенесены в стерилизованную посуду под резиновую пробку для использования и хранения. Предварительно перед закупоркой флакона была взята проба в объёме 4 мл для контроля стерильности.

Определение концентрации. Определение концентрации бактериальных клеток проводили посредством двух методик: чашечным методом Коха и визуальным методом по оптической концентрации при использовании стандартов оптической плотности [22].

Определение полноты инактивации. Полнота инактивации антигенов *M. haemolytica* определялась по безвредности инаktivированной бактериальной массы в биопробе на лабораторных мышах массой 16-18 гр при подкожном введении в однократной дозе и дозе, двукратно превышающей рекомендованную, в объёме 0,5 см³. Для этого бактериальную массу доводили до концентрации 6×10^9 и 12×10^9 мкр. кл. в 1 см³. В конечном результате доза для подкожного введения составила дозу – 3×10^9 мкр. кл. и двукратно превышающую иммунизирующую дозу 6×10^9 мкр. кл. Для выполнения исследования каждой серии антигена использовалось по две мыши. Наблюдение за опытными животными продолжалось в течение 7 су-

ток. Препарат считался инактивированным в случае отсутствия гибели среди животных и отсутствие каких-либо системных и местных реакций.

Контроль стерильности антигенов и моновакцин. Контроль стерильности антигенов и моновакцин был выполнен в полном соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности».

Контроль антигенной активности. Антигенную активность экспериментальных серий вакцины определяли в реакции агглютинации с сыворотками крови, полученными от вакцинированных лабораторных животных по следующей схеме:

1) получение от морских свинок, участвующих в опыте, сыворотки крови до первой вакцинации, используемой в последующем в качестве отрицательного контроля;

2) двукратная вакцинация с 21-дневным интервалом, при этом сыворотку крови получали перед второй вакцинацией, а, именно, в день вакцинации и спустя 14 дней после второй вакцинации. Полученные сыворотки использовали сразу после получения или однократно замораживали при температурном режиме -18 °С;

3) получение соматического антигена, для чего бульонную культуру подвергали термической инаktivации при 60 °С и экспозиции 30 минут. Для отделения супернатанта инаktivированную нагреванием бульонную культуру подвергали центрифугированию при 3000 об. /мин. в течение 30 минут. После окончания операции надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали в 25 мл физиологического раствора до достижения концентрации 2 млрд. мкр. кл. в 1 см³ с последующим инкубированием при 37 °С в течение 12 часов. После термостатирования суспензию повторно центрифугировали, надосадочную жидкость сливали, а осадок последовательно промывали в PBS при pH 5,0, 6,0 и 7,0 соответственно. После проделанных манипуляций концентрацию соматического антигена доводили до 2 млрд. мкр. кл. в 1 см³ с использованием PBS при pH 7,0;

4) постановка реакции агглютинации. Из сывороток готовили последовательные двукратные разведения 1:25-1:3200. Затем сыворотку переносили в серо-

логические пробирки в объёме 0,5 см³ каждого разведения. К каждому разведению сыворотки добавляли рабочую дозу антигена в том же объёме. Пробирки встряхивали для равномерного смешивания жидкостей и инкубировали в термостате в течение 24 часов, а, затем, выдерживали в бытовом холодильнике при температуре от 4 до 8 °С в течение 12 часов.

Параллельно ставили контроль самоагглютинации антигена *Mannheimia haemolytica*: к соматическому антигену добавляли физиологического раствора в равном объёме. Самоагглютинация должна отсутствовать.

Отрицательным контролем служили сыворотки крови, полученные до первой вакцинации. Отрицательные сыворотки не должны агглютинировать с антигеном.

Оценивали РА в крестах по 4х-балльной системе при просмотре в агглютино-скопе от полного просветления жидкости, при наличии хорошо выраженного зонтика (розетки) на дне, который при встряхивании разбивается, образуя мелкие хлопья (комочки, крупинки) – максимально положительный результат до отрицательного результата – жидкость практически без просветления, антиген расположен в виде пуговки.

Определение безвредности и безопасности вакцинопрепарата. Определение безвредности и безопасности применения вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота при однократном и двукратном инъектировании, а также при введении дозы двукратно превышающую рекомендованный объём было проведено в соответствии с ГОСТ 31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности» от 2014.07.01.

Определение реактогенности на целевых видах животных проводили по оценке развития общих и местных изменений после введения препарата, основными из которых стали: появление отёка или припухлости в области введения, развитие общего угнетения или ухудшением состояния, нарушение координации движений, повышение общей или местной температуры.

Оценка развития патологического процесса у вакцинированных животных разработанным препаратом проводилась после их вынужденного убоя по следующим критериям:

- степень лёгкого поражения фиксировали при обнаружении побледнения тканей и отсутствия воспалительного процесса в диаметре менее 1 см в месте инъекции;

- степень среднего поражения фиксировали при обнаружении воспалительного процесса тканей, в виде отёчности и гиперемии в диаметре 1-2 см в месте инъекции;

- степень сильного поражения фиксировали при обнаружении воспалительного процесса поверхностных и глубоких тканей диаметром 2-4 см в месте инъекирования.

3.2.3. Клинические

В работе использовали общие методы клинического исследования: осмотр, пальпацию, перкуссию, аускультацию и термометрию. Проводили общее клиническое исследование: определение габитуса (телосложения, упитанности, положения тела и темперамента животного), исследование видимых слизистых оболочек, кожи, лимфатических узлов, измерение температуры тела, пульса и числа дыхательных движений в минуту, а также посистемные исследования органов дыхательного аппарата, сердечно-сосудистой системы, пищеварительного тракта, мочеполового аппарата и нервной системы.

3.2.4. Патологоанатомические

Макроскопическое исследование органов и тканей проводили согласно «Методическим указаниям по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях» [28]. Вскрытие трупов, павших и вынужденно убитых лабораторных животных осуществляли методом полной эвисцерации, при вскрытии крупных животных использовали метод частичного рассечения анатомо-физиологических систем.

Непосредственное проведение вскрытия трупов проводили по схеме:

- наружный осмотр,
- внутренний осмотр,
- оценка полученных результатов.

Мелких животных вскрывали в спинном положении. Трупы крупного и мелкого рогатого скота вскрывали в левом боковом или полубоковом положении, учитывая, что объемистый рубец находится в левой половине брюшной полости.

Оценку полученных результатов проводили в соответствии с методологией, описанной Жаровым А.В. [10]. В случае необходимости проведения лабораторной диагностики производился отбор кусочков тканей и паренхиматозных органов, которые в последующем направлялись в лабораторию.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Клинико-морфологическое проявление мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота

В ходе выполнения диссертационной работы изучались случаи возникновения мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота в различных сельскохозяйственных предприятиях Российской Федерации. В период 2016-2017 гг. нами был обследован 21 неблагополучный пункт с зафиксированной эпизоотической вспышкой пастереллеза (пастереллезоподобных болезней), при дифференциальной диагностике которых в двух случаях установлен диагноз мангеймиоз на основании доказательства этиологической роли возбудителя *Mannheimia haemolytica* после лабораторной идентификации, еще в 3 случаях *M. haemolytica* была выделена в монокультуре из паренхиматозных органов, но ее этиологическую роль в биопrobe установить не удалось.

Ввиду того, что *Mannheimia haemolytica* чаще всего является оппортунистическим возбудителем, активирующимся при наличии предрасполагающего стресс-фактора, то зафиксировать наличие заболевания на предприятиях по клиническим признакам затруднительно. Кроме того, сложность постановки предварительного диагноза по клиническим признакам обуславливается ассоциированным проявлением заболевания, что обязывает устанавливать диагноз посредством лабораторной диагностики. Однако большинство хозяйств отказываются от комплексной лабораторной диагностики случаев заболеваемости рогатого скота респираторными болезнями, особенно в части определения вирусной и микоплазменной этиологии.

В хозяйствах, где были выделены культуры *Mannheimia haemolytica*, клиническое проявление заболевания было не одинаково. Так, наиболее свойственные для мангеймиоза признаки наблюдали на территории сельскохозяйственных предприятий Белгородской и Челябинской областей, а также Краснодарского края. В хозяйствах республики Мордовия течение заболевания и его проявление было менее выражено. Изначально данный момент нами объяснялся возможным различием серотипов, циркулирующих в данных предприятиях, что, в свою оче-

редь, в дальнейшем подтвердилось при определении серологической принадлежности выделенных культур возбудителя. Изоляты, полученные из хозяйств Белгородской области и Краснодарского края, были отнесены к серотипу А1, культура, полученная из Челябинской области, – к серотипу А2, а два штамма, полученные из республики Мордовия, не были отнесены ни к серотипу А1, ни к серотипу А2. Провести их типизацию не представлялось возможным ввиду отсутствия диагностических наборов и штаммов манхемий других известных серотипов для изготовления сывороток. Поскольку, в соответствии с литературными данными, наибольшую этиологическую значимость для крупного и мелкого рогатого скота имеет серотип А1, случаи выделения иных серотипов мы не рассматривали как причину возникновения заболевания.

Общее количество животных, имевших типичное клиническое проявление заболевания, составило 192 головы крупного рогатого скота, в том числе 27 телят в возрасте до 14 дней, 36 голов в возрасте 15-30 дней, 87 голов в возрасте от 31 дня до 6 месяцев и 42 – в возрасте более 6 месяцев. Количество мелкого рогатого скота с клиническими признаками заболевания, зафиксированного в Краснодарском крае, составило 41 голова, среди которых 17 были в возрасте до 14 дней, 13 в возрасте 15-30 дней и 11 животных в возрасте от 31-ого дня.

Из зафиксированных нами случаев прослеживается тенденция, что острое течение манхеймиоза характерно для молодняка крупного рогатого скота в возрасте от 7 дней до 6 месяцев, а среди мелкого рогатого скота наиболее восприимчивыми являются животные в возрасте от 7 дней до 3 месяцев. При этом основным клиническим признаком инфицирования данных животных являлось повышение температуры тела. Так, среднее значение данного показателя достигало $41,6 \pm 0,12$ °C у телят в возрасте до 14 дней, $41,2 \pm 0,16$ °C у животных в возрасте 15-30 дней. Средняя температура тела у ягнят в возрасте до 14 дней была равна $41,5 \pm 0,14$ °C, $40,9 \pm 0,08$ °C у животных в возрасте 15-30 дней и $39,2 \pm 0,11$ °C у животных старше 31 дня.

Пульс у телят в возрасте до 14 дней достигал значения $162 \pm 2,2$ уд. /мин., у животных в возрасте 15-30 дней значение аналогичного показателя составило

136±1,8 уд./мин.. Частота сердечных сокращений у животных в возрасте более 31 дня было в диапазоне 109,4±1,3 уд. /мин. Частота сердечных сокращений у ягнят до 14-ти дневного возраста была в пределах 115,4±0,9 уд. /мин., значение данного показателя для животных в возрасте 15-30 дней было 103,1±0,6 уд. /мин., а для особей более 31-го дня возраста средний пульс был в пределах 97,8±1,2 уд. /мин.

Учащение дыхательных движений было зафиксировано у животных всех рассматриваемых видов и возрастных групп. Так, среди молодняка КРС в возрасте до 14 дней среднее значение данного показателя составило 77±0,8 д.д./мин., для животных в возрасте 15-30 дней – 62±1,4 д.д./мин. При аускультации лёгких прослушивалось усиленное бронхиальное дыхание, а также шумы трения плевры в 18 % случаев. У МРС до 2-ух недельного возраста средняя частота дыхательных движений была равна 43,6±1,2 д.д./мин., у животных в возрасте 15-30 дней – 40,8±0,9 д.д./мин., а у животных в возрасте более одного месяца – 39,1±0,8 д.д./мин. Дыхание у животных затруднено.

У взрослых животных, всех видов, температура тела незначительно выходила за пределы физиологической нормы, т.е. на 0,1-0,2 °С, но при этом резкая смена погодных условий или изменение зоогигиенических показателей приводила к рецидиву, при котором повторно развивалась лихорадка. В этом случае температура тела на 1-1,5 °С отклонялась от физиологической нормы. На этом фоне учащался пульс и частота дыхательных движений.

Дополнительно было определено, что больные животные проявляют низкую подвижность, у них снижается аппетит, потребность в воде чаще не изменяется. У больных животных отмечали исхудание (рис. 1), сухой кашель, постепенно переходит в продуктивный, который усугубляется при физических нагрузках. Отделяемая мокрота содержала отторгнутый эпителий бронхов, слизь, серозный экссудат.



Рисунок 1 - Исхудание молодняка крупного рогатого скота при мангеймиозе

Волосняной покров у телят был взъерошенным или не плотно прилегающим. Шерстный покров у овец не изменён. Эластичность кожи сохранена или, в некоторых случаях, понижена. Целостность кожного покрова не нарушена. Болезненность, отёки, воспалительные процессы отсутствовали.

У телят и ягнят, доступные для клинического осмотра, лимфатические узлы при пальпации были в норме, в то время как у 40 % лактирующих коров с клиническими признаками заболевания (8 голов) и двух взрослых овец надвымянные лимфоузлы были опухшими, болезненными с повышением местной температуры. Кроме того, молочная железа у данных овец была с синюшным оттенком.

Слизистые оболочки ротовой полости и носовых ходов гиперемированы. Из носовых ходов больных животных, преимущественно молодняка, отмечали обильные слизистые, серозно-слизистые выделения (рис. 2).



Рисунок 2 - Обильные слизистые выделения из носовых ходов у молодняка крупного рогатого скота при мангеймиозе

В 19 случаях, совместно с проявлением легочной формы заболевания, наблюдалась кишечная форма, проявляющаяся диареей без примесей крови. Все случаи были отмечены исключительно у молодняка до полуторамесячного возраста.

Признаки заболевания у взрослых животных были аналогичными тем, что мы зафиксировали у молодняка, но проявление было более сглаженным с отсутствием одного или нескольких клинических признаков и их проявлением при обострении на фоне технологических стрессов. Больные коровы и взрослые овцы отличались меньшей массой по сравнению со клинически здоровыми. Данные животные были малоподвижны, не смотря на нормальный аппетит. Молочная продуктивность у больных лактирующих коров была снижена на 21-27%.

У 12% мелкого рогатого скота, не зависимо от возрастной группы, был отмечен кератоконъюнктивит сопровождающийся помутнением роговицы. У 17 % молодняка наблюдалась диарея.

Летальность среди молодняка КРС и МРС колебалась в пределах 3-6%. Такой низкий показатель достигался благодаря активному использованию антибактериальной терапии для купирования вспышки заболевания. Так, например, на предприятии Белгородской области использовались препараты группы тетрациклинов, чередуя их с антибиотиками пенициллинового ряда и фторхинолонами. На предприятии Краснодарского края для локализации случая заболевания использовались препараты на основе энрофлоксацина и тетрациклина. При этом отмечали снижение активности антибиотиков группы тетрациклинов. Дополнительно, в качестве превентивной меры, антибактериальные средства давались животным при необходимости перегруппировки и взвешивания, что, в свою очередь, сглаживало проявление эпизоотической вспышки. При отказе от превентивных антибиотикопроцессов заболеваемость молодняка крупного рогатого скота возрастала до 60 %, летальность – до 30-40 %.

При патологоанатомическом вскрытии трупов крупного и мелкого рогатого скота были отмечены схожие поражения. Трупные изменения зависели от времени наступления смерти и от длительности хранения трупа. В случаях, когда животное пало вечером, а вскрытие производилось днём трупное окоченение было не ярко выражено. Грудные и тазовые конечности сгибались при лёгком усилии. В случае вынужденного убоя или вскрытия животного непосредственно после смерти трупное окоченение не фиксировали.

Регистрировали следующие характерные признаки: слизистая оболочка конъюнктивы КРС серо-беловатого цвета, а МРС с явлениями воспаления роговицы и конъюнктивы глаза, слизистые оболочки анального отверстия и влагалища серо-белые, бледные, слизистые оболочки ротовой полости и носовых ходов чаще всего были гиперемизованы, реже синюшными. Кожа суховатая, бледная, без жировых отложений. Шерстный покров у молодняка преимущественно тусклый, взъерошенный, у взрослых особей – тусклый, но плотно прилегающий. Подкожная соединительная ткань имела петехиальные геморрагии. У молодняка отмечали бронхиальный лимфаденит. У некоторых взрослых особей отмечали увеличение надвымянных и бронхиальных лимфоузлов, их отёчность, гиперемию с инъ-

екцией сосудов и петехиями, напряженностью капсулы. На разрезе – сочная, влажная пульпа.

В 17 % случаев регистрировали скопление жидкости соломенно-желтого цвета в брюшной полости в объеме 300-700 мл. В 9 % был обнаружен серозно-геморрагический выпот. Положение органов брюшной полости было анатомически правильное. В некоторых случаях на брюшине отмечали отложения фибрина.

При патологоанатомическом исследовании органов грудной полости фиксировалась лобулярная фибринозная бронхопневмония (рис. 3). Помимо фибринозной бронхопневмонии встречалась крупозная пневмония, сопровождающаяся отёком лёгких и серозно-фибринозным плевритом. Грудная полость в большинстве случаев содержала жидкость соломенно-желтого цвета. Объём жидкости был в диапазоне 300-1500 мл, что зависело от возраста животного и течения заболевания (рис. 4).



Рисунок 3 - Фибринозная пневмония у телёнка

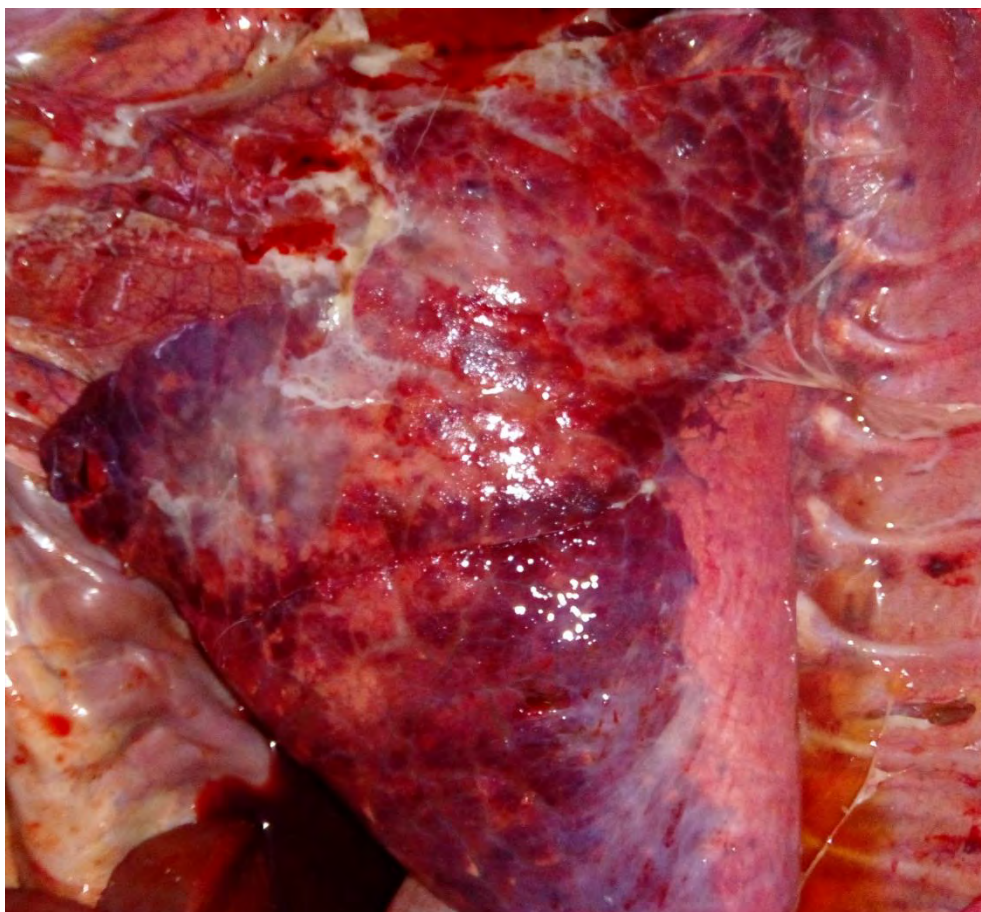


Рисунок 4 - Крупозная пневмония у телёнка в стадии красной и серой гепатизации и отёк лёгких; серозно-фибринозный плеврит (телёнок)

В некоторых случаях возбудитель был выделен от ягнят с явлениями катаральной бронхопневмонии, проявляющейся с серозно-геморрагическим воспалением бронхиальных и средостенных лимфатических узлов (рис. 5). У овец отмечали наряду с катаральной бронхопневмонией альвеолярную эмфизему.

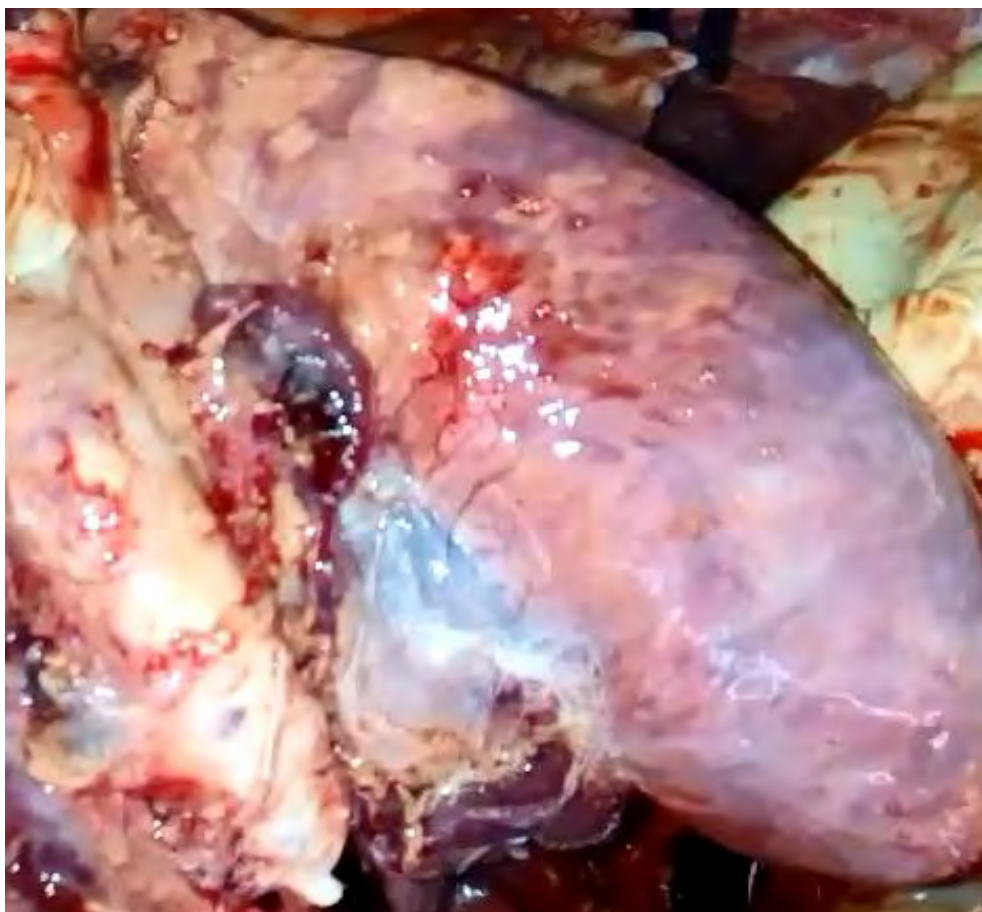


Рисунок 5 - Острый серозно- геморрагический лимфаденит бронхиальных и средостенных лимфатических узлов. Острая катаральная бронхопневмония и альвеолярная эмфизема (ягнёнок)

При инфекции часто наблюдалась бронхопневмония, сопровождающаяся интерстициальным отеком легких (рис. 6), множественными точечными кровоизлияниями и интерстициальной пневмонией (рис. 7).

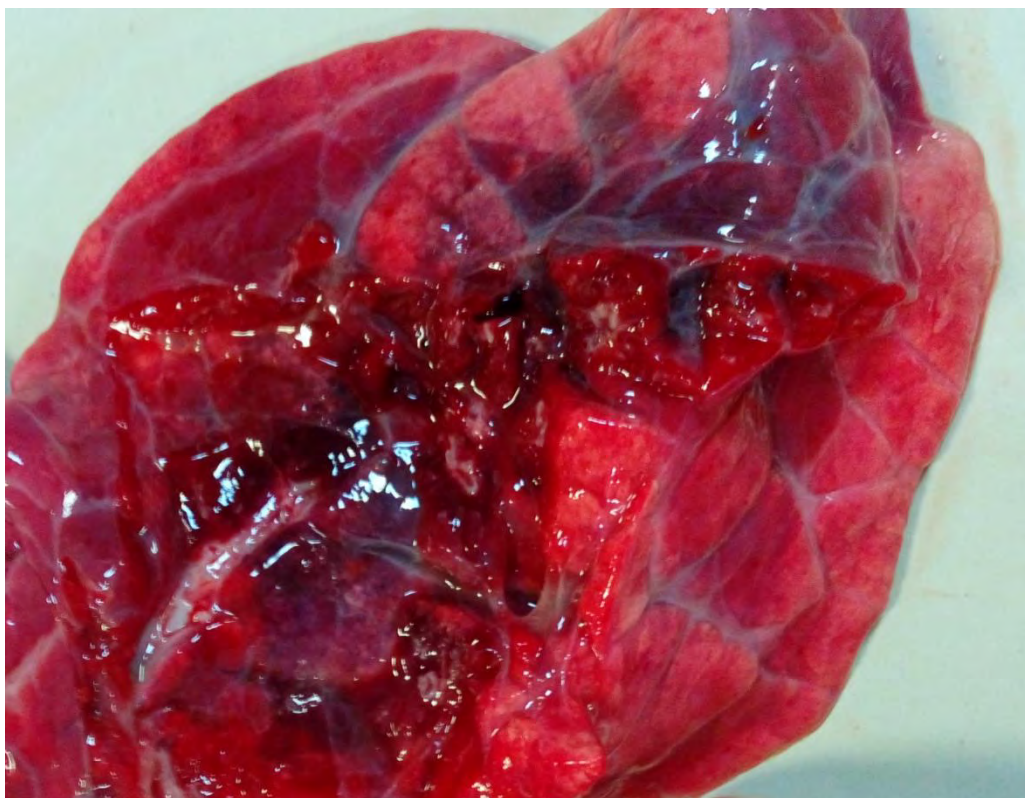


Рисунок 6 - Острая лобулярная катаральная бронхопневмония и отёк интерстиции (телёнок)

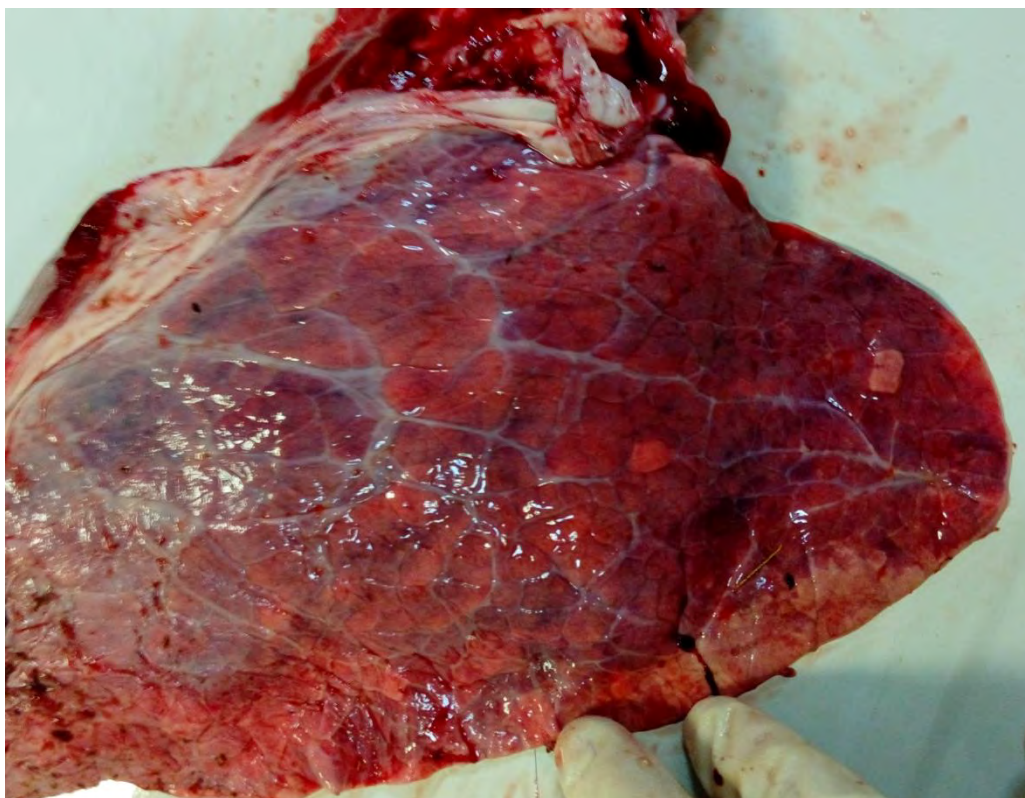


Рисунок 7 - Множественные точечные кровоизлияния; интерстициальная пневмония и отёк лёгких (телёнок)

При осмотре трахеи у молодняка крупного рогатого скота были обнаружены множественные точечные кровоизлияния с острой застойной гиперемией сосудов (рис. 8).



Рисунок 8 - Множественные точечные кровоизлияния и острая застойная гиперемия сосудов трахеи у молодняка крупного рогатого скота

У ягнят часто отмечали серозно-фибринозный перикардит, в некоторых случаях с явлениями зернистой дистрофии миокарда и застойной гиперемии с инъекцией коронарных сосудов (рис. 9). При этом у взрослых особей воспаление перикарда было зафиксировано в подавляющем количестве случаев.

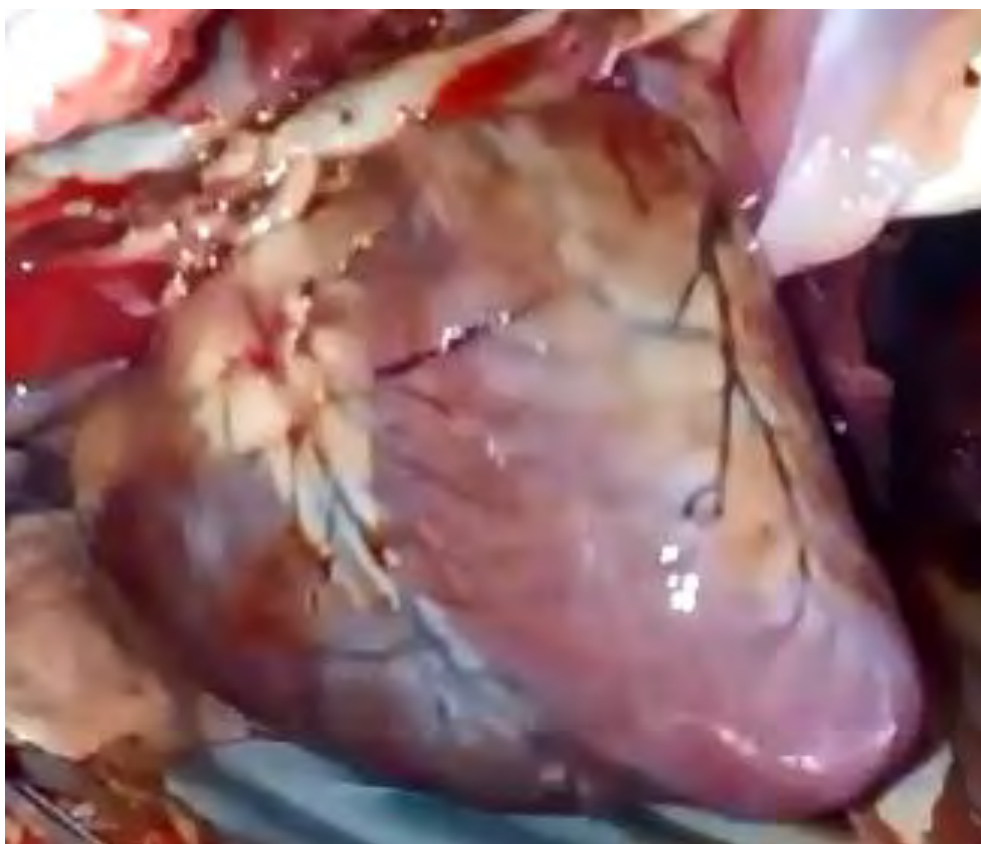


Рисунок 9 - Серозно-фибринозный перикардит; белковая (зернистая дистрофия) дистрофия миокарда; острое расширение правого желудочка сердца; острая застойная гиперемия с инъекцией коронарных сосудов (ягнёнок)

При исследовании органов пищеварительного тракта телят и ягнят были обнаружены кровоизлияния на слизистых оболочках.

В случаях, где исключительная этиологическая роль мангеймии в заболевании и гибели животных была не очевидна, отмечали разнообразие патоморфологических проявлений болезни – от катаральной бронхопневмонии до фибринозного нефрита, что, на наш взгляд, может объясняться ассоциированным характером возникновения заболевания, при котором сложно зафиксировать поражения, свойственные лишь для одной болезни.

4.2. Совершенствование лабораторной диагностики мангеймиоза

Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных является основой эпизоотического благополучия государства, ввиду чего возникает необходимость поддержания нормативных документов, регламентирующих проведения комплекса диагностических исследований, в актуальном состоянии. Обозначенная необходимость является следствием получения новых данных о заболевании или о его возбудителе, а также разработки и/или совершенствования отдельных методов диагностирования. В качестве примера данной ситуации стоит обратить внимание на действующий принцип проведения лабораторной диагностики пастереллёза, вызванного бактериями вида *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* (ранее *Pasteurella haemolytica*).

Единственным утверждённым и официально действующим документом, регламентирующим все этапы лабораторной диагностики пастереллёза, в нашей стране, являются «Методические указания по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц» №22-7/82, утверждённые 20 августа 1992 года. В соответствии с действующими указаниями, основными этиологическими факторами пастереллёза сельскохозяйственных являются виды *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica*, несмотря на то, что эпизоотические, патогенетические, клинические и патологоанатомические отличия заболеваний, вызванных этими видами, весьма существенные:

1) вид *Pasteurella haemolytica* ранее был реклассифицирован в отдельный род и назван *Mannheimia haemolytica*, то есть по существующим нормативным документам заболевание пастереллёз вызывают разные родовые представители семейства *Pasteurellaceae*. В рассматриваемом нами случае, заболевание, вызванное манхемией, требует выделения в отдельную нозологическую единицу ввиду его оппортунистических особенностей и совершенствования лечебно-профилактических подходов;

2) пастереллёз, вызванный бактериями вида *Pasteurella multocida*, наблюдается у всех видов сельскохозяйственных животных и птиц, а также человека, в то время как пастереллёз, спровоцированный *Mannheimia haemolytica*, – манхеймиоз, наблюдается преимущественно у жвачных видов животных, и пока нет описанных случаев заболевания у моногастричных животных, птиц, человека, причиной которого являлась манхеймия;

3) бактериальный агент *Mannheimia haemolytica* является возбудителем факторного заболевания, ввиду чего первопричиной развития самостоятельного заболевания чаще не является, при этом возбудитель длительное время способен находиться в организме животного без нанесения вреда его здоровью. В то время как вид бактерий *Pasteurella multocida* является первичным этиологическим фактором заболевания;

4) в соответствии с этиологической значимостью серотипов *Mannheimia haemolytica*, заболевание восприимчивых животных способен провоцировать только серотип A1, в отличие от пастерелл, среди которых заболевание способны вызывать все серотипы;

5) установлено отсутствие возможности формирования перекрёстного иммунитета при использовании средств специфической профилактики, содержащих антигены различных типов *Pasteurella multocida* в хозяйствах, где циркулирует *Mannheimia haemolytica*. Аналогичная ситуация наблюдается и при назначении специфической лечебной терапии с использованием противопастереллёзных сывороток. Иными словами, препараты против пастереллёза не способны защитить против манхеймиоза;

6) биологические особенности *Mannheimia haemolytica*, не демонстрируют патогенность по отношению к лабораторным животным при использовании обычных методов инфицирования, в то время как бактерии вида *Pasteurella multocida* проявляют патогенные свойства для лабораторных животных;

7) особенности клинко-эпизоотического проявления манхеймиоза требуют иных, более лояльных, подходов в противоэпизоотической работе и проведении мероприятий в неблагополучном хозяйстве, возможно, без наложения ограничений на хозяйственную деятельность;

8) патогенные и токсигенные свойства манхемий обуславливают пересмотр требований ветеринарной санитарии и ветеринарно-санитарной экспертизы при выявлении возбудителя в продуктах животного происхождения относительно имеющихся требований, сформированных в отношении пастереллезной обсемененности.

Ввиду вышеприведённого обоснованным решением является выделение заболевания, вызванного *Mannheimia haemolytica*, в отдельную нозологическую единицу – манхеймиоз.

С целью структурирования научных данных о заболеваниях, а также для актуализации существующих подходов диагностирования пастереллёза и манхеймиоза нами были разработаны методические указания «Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей» от 01.12.2016 и «Диагностика манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота» от 28.08.2017, утверждённые РАН [18, 20, 104] [приложение 1, 2].

В разработанных нами указаниях, на основании реализованных исследований, приведены сведения о культуральных, морфологических, биохимических, серологических и биологических свойствах возбудителей пастереллёза и манхеймиоза, а также подробно описаны клинко-патоморфологические особенности заболеваний, вызванных действием указанных возбудителей. Определён порядок отбора, транспортирования и проведения лабораторных исследований патологического и клинического материала в целях обнаружения возбудителя.

При достаточном уровне необходимости обновления методических указаний по диагностике пастереллёза и манхеймиоза нами была усовершенствована схема лабораторной диагностики данных заболеваний (рис. 10, 11). Так, например, вследствие отсутствия проявления патогенности манхемий в отношении лабораторных животных при обычном способе инфицирования, в представленных указаниях нами исключен метод биологического выделения бактерий. В разработанных методических указаниях усовершенствована схема биохимической идентификации манхемий и пастерелл, включающие все 6 видов манхемий: *Mannheimia caviae*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, *Mannheimia ruminalis*, *Mannheimia granulomatis*, *Mannheimia varigena* и 14 видов пастерелл: *P. aerogenes*, *P. bettyae*, *P. caballi*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. langaaensis*, *P. lymphangitidis*, *P. mairi*, *P. multocida*, *P. oralis*, *P. pneumotropica*, *P. skyensis*, *P. stomatis*, *P. testudinis*. Кроме того, в разработанных указаниях устаревшие и снятые с производства средства серологической идентификации, а также методы индикации заменены современными.

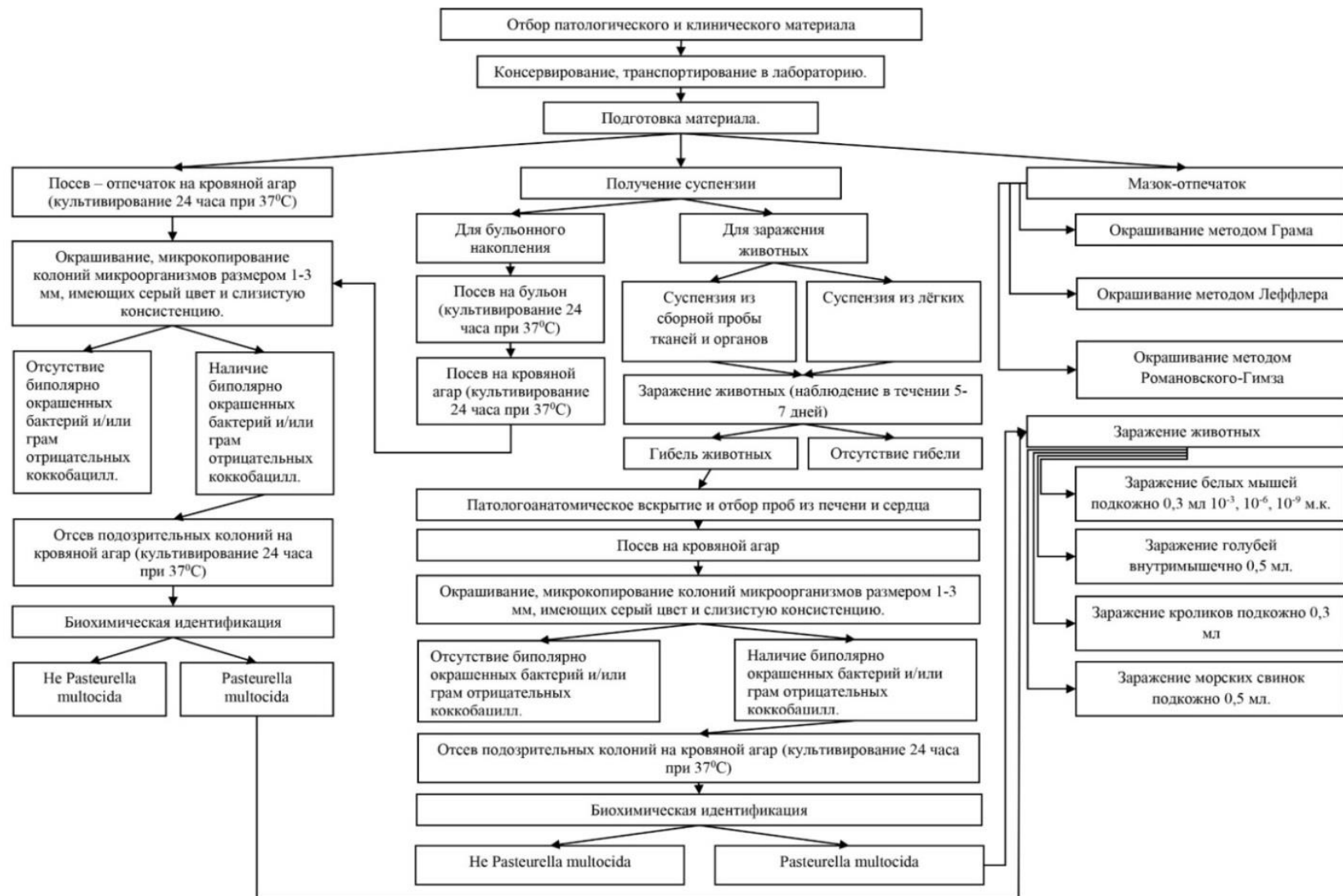


Рисунок 10 - Схема проведения бактериологического исследования клинического и патологического материала с целью подтверждения диагноза – пастереллез



Рисунок 11 - Схема проведения бактериологического исследования клинического и патологического материала с целью подтверждения диагноза – манхеймиоз

Основной принцип предлагаемых схем основан на выделении из патологического и/или клинического материала даже минимальной концентрации возбудителя. Для этого проведение бактериологического исследования реализуется одновременно по четырём направлениям для подтверждения пастереллёза и по трём направлениям для подтверждения манхеймиоза, общими из которых являются:

1) проведение микроскопического исследования мазка-отпечатка секционного материала. Данный метод является наиболее экспрессивным и позволяет в течение 30 минут подтвердить или опровергнуть наличие в исследуемом материале бактериальных клеток морфологически подобных клеткам пастерелл и манхемий, то есть грамотрицательных коккобацилл;

2) проведение прямого посева секционного материала на кровяные среды, которое позволяет спустя 24 часа зафиксировать рост пастерелл и манхемий;

3) проведение бульонного накопления бактериальных клеток из секционного материала, с целью сохранения возможных единичных клеток возбудителя пастереллёза и манхеймиоза в исследуемом материале;

4) наличие у штаммов *Pasteurella multocida* патогенных свойств, позволяющих проводить его выделение из исследуемого материала посредством биологической пробы при заражении лабораторных животных суспензией, приготовленной из тканей и органов павших животных.

Совершенствование принципов диагностики пастереллёза и манхеймиоза явилось следствием практической работы, в ходе которой из секционного материала, полученного из различных регионов РФ, было выделено 11 штаммов *Pasteurella multocida* subsp. *Multocida*, 3 штамма *Pasteurella multocida* subsp. *Septica*, 2 штамма *Pasteurella multocida* subsp. *Gallicida*, 1 штамм *Pasteurella aerogenes*, 5 штаммов *Mannheimia haemolytica*, 1 штамм *Bibersteinia trehalosi*, 1 штамм *Mannheimia glucosida*. Полученные изоляты использованы для изучения биологических свойств и аспектов эпизоотологии при манхеймиозе.

4.3. Эпизоотологические данные по пастереллёзу и манхеймиозу крупного и мелкого рогатого скота

Заболевание манхеймиоз на территории Российской Федерации ранее официально не являлось отдельно выделенной болезнью, ввиду чего инфекцию, вызванную *Mannheimia haemolytica*, признавали пастереллёзом. Именно поэтому проведение отдельных мониторинговых исследований по манхеймиозу на территории РФ никогда не проводилось, а для анализа эпизоотического благополучия по манхеймиозу стоит принимать данные по мониторингу пастереллёза. Так, по данным, приведённым в отчётах эпизоотической ситуации в РФ за 2007-2017 годы, предоставляемыми ФГУ ВНИИЗЖ совместно с ФГУ «Центр ветеринарии», можно сделать выводы о распространённости пастереллёзной инфекции в стране (см. таблицу 2).

Таблица 2 - Эпизоотическая ситуация по пастереллезу и манхеймиозу крупного и мелкого рогатого скота на территории Российской Федерации в период 2007-2017 гг.

Вид животного	Количество неблагополучных пунктов [153]										
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017*
КРС	299	248	259	210	151	141	153	102	49	38	12
МРС	36	29	24	27	27	19	20	16	10	3	2
	Количество заболевших животных										
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017*
КРС	4329	1992	1824	1723	641	1307	1299	946	343	302	87
МРС	640	162	44	158	94	109	55	20	529	29	5

* данные на 1.09.2017

Анализ приведённых в таблице 2 данных позволяет утверждать о существующей тенденции снижения количества неблагополучных скотоводческих и овцеводческих сельскохозяйственных предприятий по пастереллёзу. Так, количество неблагополучных пунктов, профилирующихся на разведении крупного рогатого скота к 2017 году снизилось в 25 раз по отношению к 2007 году. В это же время количество неблагополучных пунктов, ориентированных на разведение мелкого рогатого скота, сократилось в 18 раз.

1. По мониторинговым данным на период 2015-2017 год наибольшая инцидентность по пастереллёзной инфекции отмечена в республике Дагестан [156], Краснодарском крае [158], Ставропольском крае [159], Астраханской [160],

Нижегородской [161], Челябинской [162], Рязанской [163], Кемеровской [154], Калужской областях [164], Ямало-Ненецком автономном округе [165] и т.д., ввиду чего данные регионы являются неблагополучными по пастереллёзной инфекции, а граничащие с ними области относятся к угрожаемым зонам. В Челябинской области и Краснодарской крае были зафиксированы случаи пастереллёза, вызванного бактериями вида *Mannheimia haemolytica*.

При оценке рисков развития эпизоотического процесса стоит принимать к сведению, что наибольшей подверженности пастереллёзу и мангеймиозу будут обладать регионы Российской Федерации с наибольшей численностью поголовья, что подтверждается имеющимися данными по эпизоотическому состоянию. Так на рисунке 12 и 13 (приложение 13) приведены сведения о численности популяции крупного и мелкого рогатого скота на территории РФ на 2016 год, предоставленных ФГБУ «ВНИИЗЖ» [5].

Как видно из рисунков 12 и 13 регионы Российской Федерации с высоким уровнем поголовья животных попадают в лидеры по частоте встречаемости инфекционных патологий, в том числе по мангеймиозу. Помимо высокой концентрации животных на данных территориях, объяснить распространённость инфекционных болезней можно климатическими условиями, обеспечивающими круглогодичное циркулирование возбудителя.

При проведении исследований патологического материала, полученного из различных регионов РФ, нами были выделены изоляты возбудителя пастереллёза из патологического материала, поступившего из сельскохозяйственных предприятий Челябинской, Новгородской, Московской, Рязанской, Нижегородской, Кировской, Белгородской, областях, Ставропольском крае, а также в республике Мордовия. Возбудитель мангеймиоза был обнаружен в Белгородской и Челябинской, Краснодарском крае, а также в республике Мордовия [107].

Изученные случаи мангеймиоза позволили нам критеризировать эпизоотические аспекты болезни: заболеваемости подвержен преимущественно молодняк крупного рогатого скота в возрасте до 6-ти месяцев, а мелкого рогатого скота в возрасте до 3-ёх месяцев. Отмечена осенне-зимне-весенняя сезонность. Эпизоо-

тической вспышке способствуют: неполноценное кормление, гиповитаминозы, переболевание диспепсией в молочный период, технологические стрессы, скученность содержания, нарушение зоогигиенических норм содержания, повышенная влажность и т.д. Для мангеймиоза характерно персистирование возбудителя на восприимчивом поголовье, что обуславливает рецидивы вспышек при снижении иммунного статуса животных. Основными путями распространения инфекции являются аэрогенный и алиментарный путь (с молоком больных маток: например, при маститной форме у овец – «синее вымя»). Заболеваемость среди молодняка достигает 60 % процентов, летальность – 3-6 % в хозяйствах, использующих превентивные антибиотикообработки.

4.4. Обоснование необходимости создания и применения вакцины инактивированной против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота

Интенсификация животноводства обуславливает высокотехнологичное производство, в условиях которого стресс-нагрузка и организационные недостатки вызывают повышенную восприимчивость поголовья к инфекции. Риск проявления заболеваемости, спровоцированной оппортунистическими возбудителями, возрастает. Также возрастает и активность бактерий-оппортунистов к персистенции и клинически скрытой заболеваемости, что, в свою очередь, служит фактором развития вторичной иммунонедостаточности у поголовья в производственных условиях и предрасполагает к заболеваемости от других инфекций – пантропных вирусов и убиквитарных бактерий, обладающих патогенностью для жвачных. Использование ресурсосберегающих технологий в животноводстве позволяет снизить недополучение производимой продукции при первоначальных затратах. В качестве основной ресурсосберегающей технологии здесь стоит рассматривать обязательные профилактические обработки животных с целью предупреждения возникновения и развития инфекционных болезней - вакцинации. Вакцинация позволяет предупредить последствия, вызванные инфекцией, и связанные со значительными экономическими затратами.

Актуальной является профилактика заболеваний, риск возникновения которых появляется при введении в поголовье новых животных, а также при действии стресс-провоцирующего фактора и при развитии эпизоотических вспышек на фоне персистенции и переболевания от данной инфекции. Такими заболеваниями являются факторные инфекции пастереллезной группы, которые не всегда проявляются при карантине, в частности, манхеймиоз.

На территории Российской Федерации, согласно данным Россельхознадзора за 2017 год, зарегистрировано шесть биопрепаратов для специфической профилактики манхеймиоза, но на момент начала выполнения диссертационной работы, в 2014 году, их было всего два. БарВак 10 – производства фирмы «Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH» датой регистрации 13.12.2013 и Комбовак-Р – отечественного производства ООО «Ветбиохим», датой государственной регистрации 14.03.2012. Оба препарата – ассоциированные, с большим антигенным составом, что не всегда эффективно при использовании в реальных практических условиях наших хозяйств с большой долей гипотрофии и недостаточности иммунного статуса среди молодняка. Кроме того, испытание данных комбинативных средств по манхеймиозному антигену исследовано недостаточно.

Иностранный препарат в качестве основного направления иммуногенной защиты в большей степени ориентирован на профилактику клостридиозов, что подтверждается его антигенным составом. Так, в состав препарата БарВак 10 входят 6 антигенов клостридий, а также *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida*. Отечественный препарат Комбовак-Р был разработан для профилактики инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи и вирусной респираторно-синцитиальной инфекции, а также пастереллёза, вызванного *Pasteurella multocida* сероварами А, В, D и *Mannheimia haemolytica*. С точки зрения практического применения стоит считать, что «Комбовак-Р» более адаптирован к применению в условиях России, так как направлен на профилактику ряда респираторных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии, ассоциации которых наиболее распространены. Кроме того, данные препараты не предусматривают профилактику манхеймиоза мелкого рогатого скота.

Необходимость исследований и создания отечественной технологии производства вакцинопрепарата или вакцинокомпонента против мангеймиоза продиктована развитием импортозамещения в отрасли и эпизоотической ситуацией, требующей разработки новых иммунобиологических препаратов на основе актуальных иммуногенных эпизоотических штаммов.

4.5. Характеристика выделенных изолятов *Mannheimia haemolytica*

При проведении комплексного бактериологического исследования проб клинического и/или патологического материала в период с 2014 по 2017 год из неблагополучных по пастереллёзу и мангеймиозу сельскохозяйственных предприятий были выделены и идентифицированы 16 изолятов *Pasteurella multocida*, 5 изолятов *Mannheimia haemolytica*. Идентификацию проводили на основании изучения культуральных, тинкториальных, морфологических, биохимических, серологических и биологических свойств. Выделенные при бактериологическом исследовании изоляты бактерий вида *Mannheimia haemolytica* на кровяном агаре образовывали гладкие, полупрозрачные, блестящие колонии в диаметре 1-2 мм с проявлением зоны β -гемолиза в размере 1-1,5 мм вокруг колонии (рис. 14 и 15).



Рисунок 14 - Рост колоний *Mannheimia haemolytica* на кровяном агаре спустя 24 часа термостатирования при 37 °С. (трёхкратное увеличение)

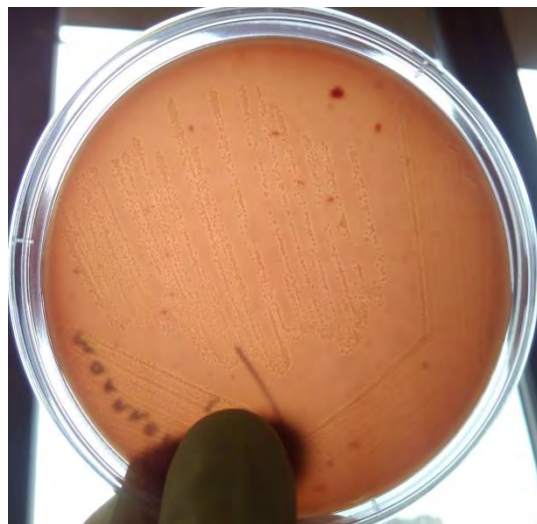


Рисунок 15 - β -гемолиз колоний *Mannheimia haemolytica* на кровяном агаре спустя 24 часа термостатирования при 37 °С. (диаметр чашки Петри = 90 мм)

Все выделенные изоляты вида *Mannheimia haemolytica* росли на агаре Мак-Конки в виде мелких полупрозрачных колоний. На мясо-пептонном агаре бактерии демонстрировали скудный рост мелких выпуклых, полупрозрачных колоний размерами 0,5-1 мм, легко снимающихся бактериальной петлёй или пастеровской пипеткой. Изучаемый возбудитель на агаризированных средах имел S-форму, шероховатая или мукоидная форма колоний не была зафиксирована, даже при длительном хранении культур. Кроме как на кровяных средах обильный рост колоний *Mannheimia haemolytica* наблюдался на питательной среде для культивирования гемофилюсов и актинобациллюсов *Haemophilus test medium* HTM base производства Oxoid с добавлением компонента *Haemophilus Growth Supplement* FD117, из расчёта 1 флакон добавки на 500 мл среды. На данной среде бактерии обильно образовывали гладкие, прозрачные, блестящие колонии размером 1-1,5 мм (рис. 16).



Рисунок 16 - Рост колонии *Mannheimia haemolytica* на среде CM0898 с добавкой FD117

В бульонных средах, т.е. мясо-пептонном бульоне, триптон-соевом бульоне, бульоне Хоттингера, Эугоник бульоне, а также в сердечно-мозговом бульоне наблюдалось равномерное помутнение среды уже спустя 12 часов культивирования при температурном режиме 37-38 °С, максимальное накопление при стационарных условиях достигалось к 16-18 часу. При необходимости сокращения периода культивирования было использовано постоянное встряхивание пробирок с

питательной средой при помощи шейкера, помещённого в термостат с режимом вращения 50-60 оборотов в минуту. При таких условиях видимое помутнение среды проявлялось уже спустя 5-6 часов культивирования. Рост в полужидком агаре проявлялся только по ходу укола петлёй, что рассматривалось как свидетельство отсутствия подвижности у изучаемых изолятов.

При проведении микроскопического исследования бактериальные клетки имели вид грамтрицательных коккобацилл, приблизительные размеры которых были в диапазоне 0,3-1,0x1,0-2,0 мкм. Расположение клеток в мазке было чаще одиночное, реже – парное. Расположение клеток цепочками не было зафиксировано. При хранении в нативной форме не было обнаружено явлений спорулирования культур. При окрашивании культур манхемий методом Романовского-Гимза обнаруживали клетки тёмно-синего цвета с розовой капсулой.

Результаты изучения биохимических свойств бактерий вида *Mannheimia haemolytica*, приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Биохимические свойства штаммов *Mannheimia haemolytica*

Показатель	<i>Mannheimia haemolytica</i> KAB-1	<i>Mannheimia haemolytica</i> AM9	<i>Mannheimia haemolytica</i> 219	<i>Mannheimia haemolytica</i> 207	<i>Mannheimia haemolytica</i> 217
1	2	3	4	5	6
Каталаза	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-
Аргининдекарбоксилаза	-	-	-	-	-
Образование H ₂ S	-	-	-	-	-
Образование индола	-	-	-	-	-
ОНПГ	+	+	+	-	+
Уреаза	-	-	-	-	-
Реакция VP	-	-	-	-	-
Желатиназа	-	-	-	-	-
D-адонитола	-	-	-	-	-
L-арабинозы	-	-	-	-	-
Арбутина	-	-	-	-	-
Целлобиозы	-	-	-	-	-

1	2	3	4	5	6
Декстрина	+	+	+	+	+
Дульцитола	-	-	-	-	-
Фруктозы	+	+	+	+	+
D-галактозы	+	+	+	+	+
D-глюкозы	+	+	+	+	+
Глицерола	+	-	+	-	+
Инулина	-	-	-	-	-
Лактозы	+	+	+	+	+
Мальтозы	+	+	+	+	+
D-маннитола	+	+	+	+	+
D-маннозы	-	-	-	-	-
Мелицитозы	-	-	-	-	-
Мелибиозы	-	-	-	-	-
Раффинозы	+	+	+	+	+
L-рамнозы	-	-	-	-	-
Салицина	-	-	-	-	-
D-сорбитола	+	+	+	+	+
L-сорбозы	-	-	-	-	-
Сахарозы	+	+	+	+	+
Трегалозы	-	-	-	-	-
D-ксилозы	+	+	+	+	+
Гидролиз эскулина	-	-	-	-	-
Рост на агаре МакКонки	+	+	+	+	+
Образование газа из D-глюкозы	-	-	-	-	-
В-гемолиз	+	+	+	+	+

Как видно из приведённых в таблице 3 данных при определении биохимических свойств было установлено, что культуры манхемий оксидаза- и каталазаположительны, в реакции Фогес-Проскауэра имеют отрицательный результат, не гидролизуют эскулин, не разжижают желатин, не ферментируют адонитол и трегалозу. Тесты на аргининдегидролазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, уреазу, индол – отрицательны. Ферментирует лактозу, ксилозу, арабинозу, сахарозу, мальтозу, фруктозу, маннитол, галактозу и глюкозу [108, 106].

4.6. Определение этиологически значимых культур *Mannheimia haemolytica*

Ввиду отсутствия коммерческих средств и наборов для серотипирования бактерий вида *Mannheimia haemolytica* нами была выполнена серия опытов по серотипизации имеющихся штаммов в реакции непрямой гемагглютинации

(ИНАtest) по методике, предложенной Е.Л. Биберстейном [50]. Реакция ИНА производилась с целью подтверждения гомогенности капсульного антигена изучаемой культуры с капсульным антигеном штамма известного серотипа.

В качестве комментария стоит акцентировать внимание на то, что соматический антиген *Mannheimia haemolytica*, не имеет доказанной значимости для серотипирования [50]. Это объясняется тем, что серотипы данного вида определяется по капсульному антигену, который для штаммов *Mannheimia haemolytica* имеет следующие обозначения: A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 и A17, где символ «А» определяет принадлежность к биовару.

Ввиду того, что основным этиологическим фактором манхеймиоза на территории РФ является серотип A1, в то время как иные серотипы реже имеют эпизоотическое значение и не вызывают инфекционной патологии, нами была поставлена задача подтвердить или опровергнуть наличие среди выделенных нами полевых изолятов *Mannheimia haemolytica* именно данного серотипа. Невозможность серотипизации всех имеющихся культур была обусловлена отсутствием тест-культур заранее известных серотипов.

Среди имеющихся штаммов с известной серогрупповой принадлежностью был штамм коллекции ATCC 33396, относящийся к серотипу A2, производственный штамм №169 и КМИЭВ-B158, относящиеся к серотипу A1.

Для получения антисывороток нами были использованы морские свинки массой 350-450 гр. На каждый штамм с известным серотипом (ATCC 33396, №169 и КМИЭВ-B158) использовалось по две морские свинки. Дополнительно две морские свинки использовались для контроля выживаемости при гипериммунизации.

Капсульный тип антигенов был определён следующим методом:

1) гипериммунизация животных с использованием полных микробных антигенов *Mannheimia haemolytica*. Для реализации данного этапа исследования от животных, используемых в опыте, была получена сыворотка крови в качестве отрицательного контроля. Затем животным 1 раз в 7 дней подкожно вводили инактивированную суспензию бактериальных клеток соответствующего штамма в концентрации 6 млрд. мкр. кл. в 1 см³. Объём вводимой разовой дозы

составлял 2 мл, т.е. конечная концентрация антигена составила 12 млрд. мкр. кл. в 1 см³. Для каждой группы животных процедура была проделана 7 раз в течение 42 дней. За весь период наблюдения 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 инфицированию. Отбор крови для получения сыворотки производился спустя 14 дней после последней инъекции. Сыворотки соответствующих групп свинок объединялись;

2) получение капсульного антигена *Mannheimia haemolytica* для постановки реакции непрямого гемагглютинации было выполнено с использованием суточной культуры, выращенной на триптон-соевом бульоне. Бульонную культуру подвергали термической инактивации при 60 °С продолжительностью 30 минут. С целью получения супернатанта инактивированная нагреванием бактериальная масса была центрифугирована при 3000 об\мин в течение 30 минут. После окончания операции надосадочная жидкость перемещалась в стерильную пробирку типа Falcon и использовалась в последующем в качестве капсульного антигена при постановке реакции непрямого гемагглютинации. Данным образом были получены капсульные антигены всех имеющихся штаммов манхемий (КАВ-1, АМ9, № 219, № 207, №217, АТСС 33396, №169, КМИЭВ-В158);

3) получение эритроцитов крови крупного рогатого скота было выполнено по следующей схеме. Для постановки реакции непрямого гемагглютинации необходимым условием являлось наличие эритроцитов восприимчивых видов животных. Для этого от молодого бычка была получена дефибринированная кровь в объёме 250 мл. Затем дефибринированную кровь, для осаждения тяжёлых форменных элементов, подвергали центрифугированию при 2500 об./мин., общей продолжительностью 5 минут, после чего эритроциты дважды подвергались промывке солевым раствором фосфатного буфера с последующим повторным центрифугированием при аналогичном режиме до получения прозрачной надосадочной жидкости;

4) адсорбция капсульных антигенов на поверхности эритроцитов. Эритроциты крупного рогатого скота в объёме 0,2 мл смешивали с 20 см³ кап-

сильного антигена каждого штамма. С целью прочной фиксации адсорбированных антигенов на эритроцитах в смесь было добавлено 200 мкл глутаральдегида. Инкубировали при 37 °С в течение 1 часа при плавном помешивании. В результате выполнения данной процедуры нами были получены адсорбированные эритроцитами антигены в низкой концентрации, для их концентрирования смесь была подвергнута двойному центрифугированию при 2500 об./мин. в течение 5 минут с промывкой PBS. После окончания второго центрифугирования и удаления супернатанта оставшийся объём эритроцитов был суспендирован в 20 см³ PBS для достижения конечной концентрации эритроцитов равной 1 %;

5) постановка реакции непрямой гемагглютинации (IHAtest). 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 4, 5, 6.

Таблица 4 - Результаты реакции непрямой гемагглютинации с использованием антисывороток полученных от гипериммунизированных 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
КАВ-1	A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AM9	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 219	C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 207	D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№217	E	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ATCC33396	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№169	G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
КМИЭВ-B158	H	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Как видно из таблицы 4, сыворотки, полученные от гипериммунизированных животных штаммом №169, демонстрируют положительную реакцию агглютинации со штаммами КАВ-1, №217, №169 и КМИЭВ-B158 в разведении 1:128, 1:32, 1:256 и 1:128 соответственно. Агглютинацию сыворотки с антигеном штаммов № 219 и № 207 мы не рассматривали как специфическую связь ввиду низкой степени разведения. Отрицательный контроль с использованием сыворотки, по-

лученной до начала гипериммунизации свинок, был поставлен в лунках 12-ого вертикального ряда и продемонстрировал отсутствие агглютинации с сенсibilизированными эритроцитами в любых разведениях.

Таблица 5 - Результаты реакции непрямой гемагглютинации с использованием антисывороток, полученных от гипериммунизированных морских свинок штаммом КМИЭВ-В158

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
КАВ-1	A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AM9	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 219	C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 207	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№217	E	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ATCC33396	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№169	G	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
КМИЭВ-В158	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Как видно из данных таблицы 5, сыворотка, полученная от животных, гипериммунизированных штаммом КМИЭВ-В158, демонстрирует положительную реакцию агглютинации со штаммами КАВ-1, №217, №169 и КМИЭВ-В158 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.

Таблица 6 - Результаты реакции непрямой гемагглютинации с использованием антисывороток, полученных от гипериммунизированных 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.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
КАВ-1	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM9	B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
№ 219	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 207	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№217	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC33396	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
№169	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
КМИЭВ-В158	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Как видно из таблицы №6, сыворотка, полученная от гипериммунизированных животных штаммом ATCC 33396, демонстрирует положительную реакцию агглютинации со штаммами ATCC 33396 и AM9 в разведениях 1:512 и 1:128 соответственно.

Результатом проведенного опыта можно считать то, что штаммы бактерий вида *Mannheimia haemolytica* №169, КМИЭВ-B158, КАВ-1 и №217 в реакции не-прямой гемагглютинации, предложенной Биберстейном Е.Л., имеют одинаковый капсульный антиген, что говорит о возможной принадлежности их к серотипу A1. Не смотря на зафиксированную однородность капсульного антигена, мы не можем окончательно утверждать, что культуры КАВ-1 и №217 относятся к серотипу A1, так как этот серотип имеет схожий антигенный состав с серотипом A6. Тем не менее, проведенный опыт позволил нам сократить диапазон изучаемых штаммов.

Штамм AM9 проявляет схожесть по капсульному антигену со штаммом ATCC 33396, что стоит рассматривать как принадлежность данного штамма к серотипу A2.

Изучение патогенных и вирулентных свойств изолятов *Mannheimia haemolytica* позволило произвести подбор наиболее подходящих штаммов для последующего использования их в качестве производственных и контрольно-производственных. Во время проведения этого этапа исследования были выполнены несколько серий опытов, первый из которых заключался в определении патогенности штаммов *M. haemolytica* с использованием лабораторных животных (2 белые мыши, на один испытуемый штамм, заражались и 2 мыши были контрольными), второй опыт заключался в определении степени патогенности штаммов, выраженном в показателе LD₅₀, т.е. определении вирулентности.

Реализация поставленной задачи поэтапно проводилась в следующей последовательности:

1) Подкожное заражение белых мышей. Ввиду изначально низкой патогенности штаммов *Mannheimia haemolytica* для лабораторных животных первый опыт заключался в провоцировании гибели лабораторных белых мышей массой

16-18 гр. путём подкожного введения высокой концентрации бактериальных клеток *Mannheimia haemolytica* - 5 млрд. микробных клеток в 1 см³ бульона, вместо стандартной концентрации 1 млрд. микробных клеток. Ввиду наличия у изучаемого бактериального агента активного токсина, инфицирующая суспензия была подготовлена и использована в двух вариациях: 24-часовая агаровая культура и 48-часовая бульонная культура. Необходимость увеличения культивирования до 48 часов была обусловлена необходимостью достижения логарифмической фазы роста бактерий и закисления питательной среды для наступления фазы продуцирования токсина.

Каждый испытуемый штамм был подкожно введён 2 белым мышам в объёме 1 см³, наблюдение за животными продолжалось в течение 7 суток или до момента их гибели. В качестве контроля оставались 4, не инфицированных, белых мыши. Общее количество животных, используемых в опыте для восьми штаммов манхемий, составило 36 голов, в частности 18 – для изучения патогенности суспензии клеток с плотных питательных сред, 18 – для изучения патогенности бульонных культур с токсином и 4 контрольных головы. Не смотря на то, что ранее при проведении серологической идентификации манхемий, принадлежность к серотипу A1 была доказана только для штаммов КАВ-1 и №217, изучение патогенности проводили для всех имеющихся штаммов ввиду целесообразности отработки метода воспроизведения экспериментальной инфекции.

Результатом проведённого опыта стало подтверждение непригодности использования подкожного инфицирования белых мышей клетками *Mannheimia haemolytica* с целью определения патогенности штамма. Ни одно из подопытных животных не погибло в течение наблюдаемого периода.

Для получения полной картины развития инфекционного процесса девять мышей (по одной из каждой группы, заражённых разными бульонными культурами, и одна контрольная мышь), были подвергнуты эвтаназии. Для этого внутривенно в хвостовую вену предварительно вводился пропофол в дозе 0,1 мл, с последующим введением магния сульфата в объёме 0,2 мл. Использование препара-

тов в данной комбинации позволили спровоцировать гибель лабораторных животных вызванную остановкой сердца.

При проведении вскрытия было зафиксировано полное отсутствие поражений паренхиматозных тканей у инфицированных и контрольных животных.

При проведении бактериологического исследования проб легочных тканей, полученных от мышей с целью выделения введённого инфицирующего агента, результат был отрицательным, не подтвердив наличие возбудителя в органах. При интерпретации полученного результата, а также при анализе литературных данных было сделано предположение о том, что подкожное введение возбудителя белым мышам не способно привести к развитию инфекционной патологии, вследствие чего данный способ инфицирования не является подходящим и должен быть заменён.

2) Использование иммунодефицитных линий белых мышей. Полученные во время проведения первого опыта результаты обосновали необходимости смены подхода к изучению патогенности манхемий. Целесообразность в использовании лабораторных животных с пониженным иммунным статусом для воспроизведения инфекции и провоцирования их гибели была обусловлена механизмом развития инфекционного процесса среди крупного и мелкого рогатого скота. В качестве предрасполагающих условий возникновения инфекции являются стрессовые факторы, в т.ч. первичные вирусные инфекционные патологии – пусковой механизм острой респираторной инфекции, что в обоих случаях, является причиной вторичной иммуносупрессии. Для опыта были использованы белые мыши линии SCIDBEIGE, имеющие сниженный уровень Т- и В-лимфоцитов, а также низкую активность NK-клеток. С целью сокращения периода развития инфекционного процесса путём ускорения колонизации дыхательных путей было решено изменить метод подкожного инфицирования на интраназальный, при котором объём вводимой заражающей суспензии составлял бы 0,2 мл. с концентрацией 25 млрд. мкр. кл. в 1 см³, что составляет 5*10⁹ мкр. кл. в 0,2 мл. заражающей суспензии. Для достижения указанной концентрации суточная бульонная культу-

ра была сконцентрирована с использованием центрифуги при режиме 3000 об./мин. в течение 15 минут.

Поскольку используемая линия мышей обладала первоначальным иммунодефицитом, было принято решение использовать только 24-часовую бульонную культуру для инфицирования.

Процедуру интраназального инфицирования мышей осуществляли при помощи катетеров для внутривенного введения без иглы. Каждым штаммом проводили заражение двух мышей. Общее количество использованных животных составило 18, из которых 16 были опытными и 2 – контрольными. Наблюдение за животными вели в течение 7 дней или до момента наступления гибели. Результаты проведения исследования приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты изучения патогенности штаммов *Mannheimia haemolytica* при интраназальном заражении иммунодефицитных линий мышей (n=18)

Номер штамма	Количество животных		Период гибели после заражения (дней)
	Заражено	Пало	
КАВ-1	2	2	2-4
АМ9	2	0	-
№219	2	0	-
№207	2	1	4
№217	2	2	4-5
№169	2	2	2-4
КМИЭВ-В158	2	2	3-4
33396	2	0	-

Как видно из данных таблицы 7, наличие патогенности проявляется у штаммов КАВ-1, №217, №169 и КМИЭВ-В158. Данные штаммы спровоцировали гибель двух испытуемых лабораторных животных в период 4, 5, 4, 4 дня после инфицирования соответственно, при этом штамм №207 не был признан патогенным, т.к. вызвал гибель одной мыши.

При проведении патологоанатомического исследования погибших животных было зафиксировано наличие отёка и застоя крови в лёгких у инфицированных животных и полное отсутствие лёгочных поражений у незаражённых мышей.

При проведении бактериологического исследования лёгочных тканей на предмет наличия введённого возбудителя нами зафиксировано, что культура

Mannheimia haemolytica была обнаружена в малом количестве из образцов, полученных от животных, заражённых всеми четырьмя патогенными штаммами.

3) Создание иммунодефицитных животных в условиях вивария.

Суть опыта заключалась в предварительной иммуносупрессии животных с использованием дексаметазона. Стоит отметить, что для данного опыта при определении патогенных свойств изолятов манхемий было использовано удвоенное количество белых мышей. Для выполнения данного этапа исследования, мышам за 120 часов до инфицирования внутримышечно вводили 0,01 мл 0,4 % раствора дексаметазона из расчёта 0,5 мг действующего вещества на 1 введение в течение 4 дней. На пятый день мыши подвергались интраназальному инфицированию суточной бульонной культурой *M. haemolytica*. В качестве контроля использовали четыре мыши, также подвергнувшись иммуносупрессии, но оставшиеся не инфицированными. Период наблюдения за животными составлял 7 дней. Результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8 - Результаты изучения патогенности штаммов *Mannheimia haemolytica* при интраназальном заражении мышей, предварительно подвергнувшись иммуносупрессии дексаметазоном (n=36)

Номер штамма	Количество животных		Период гибели после заражения (дней)
	Заражено	Пало	
КАВ-1	4	4	2-5
АМ9	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
33396	4	1	4

При анализе данных, приведённых в таблице 8, можно прийти к заключению, что патогенностью обладают культуры КАВ-1, №217, №169 и КМИЭВ-В158. Разработанный метод позволил получить аналогичные результаты, что и при использовании естественно иммунодефицитных линий мышей.

При проведении патологоанатомического исследования погибших животных были зафиксированы лёгочные поражения аналогичные тем, что обнаружены у иммунодефицитных линий мышей, то есть наличие отёка и застоя крови в лёг-

ких у инфицированных животных и полное отсутствие лёгочных поражений у не заражённых мышей.

При проведении бактериологического исследования патматериала, полученного от павших животных. От всех погибших животных была выделена культура инфицирующего штамма.

Определение вирулентности штаммов по показателю LD₅₀ было проведено с использованием лабораторных животных, искусственно подвергнувшихся иммуносупрессии с помощью дексаметазона. Определение вирулентности проводили только для тех штаммов, которые обладали патогенностью, – *M. haemolytica* КАВ-1, №217.

Для каждого штамма было сформировано по четыре группы белых мышей, по 4 мыши в каждой и одна общая контрольная группа. Заражение мышей проводили по ранее описанной методике десятикратными разведениями: 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶. Результаты определения вирулентности штаммов манхемий приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты определения величины LD₅₀ для штаммов *Mannheimia haemolytica* на белых мышах при интраназальном способе заражения (n=32)

Изолят	Инфицирующая доза, мкр. кл.	Количество зараженных животных, гол.	Погибло, гол.	LD ₅₀ мкр. кл.
1	2	3	4	5
КАВ-1	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	

Значения инфицирующей дозы 3,52 и 3,44 были получены при определении количества жизнеспособных клеток в инфицирующей суспензии чашечным методом из последних трёх разведений в 0,2 см³. Концентрация инфицирующей суспензии благодаря центрифугированию доводилась до 25 млрд. мкр. кл. в 1 см³ в соответствии с оптическим стандартом мутности ГИСК. Поскольку показатель

LD₅₀ является количественным, а реальная концентрация жизнеспособных клеток в суспензии при визуальном и чашечном методе может существенно отличаться, то концентрация определялась нами именно чашечным методом, так как он наиболее достоверный. Таким образом, было определено, что после центрифугирования концентрация живых бактериальных клеток штамма КАВ-1 была равна 17,6 млрд. мкр. кл. в 1 см³, в то время как для штамма №217 данная концентрация составила 17,2 млрд. мкр. кл. в 1 см³. Ввиду того, что возможный объём инфицирующей суспензии интраназальным способом белым мышам не должен превышать 0,2 мл, то реальная инфицирующая доза составляет одну пятую часть, то есть 3,52 и 3,44 млрд. мкр. кл. в 0,2 см³.

Определение значения показателя LD₅₀ проводили благодаря использованию пробит-анализа, реализованного при помощи программного обеспечения Viostat 2009.

Как видно из данных, приведённых в таблице №9, штамм КАВ-1 обладает большей вирулентностью, чем штамм №217, на основании чего именно его мы далее рассматривали в качестве производственного.

4.7. Выявление иммуногенных и антигенных изолятов

Mannheimia haemolytica

При производстве биологического препарата, особое внимание должно уделяться иммуногенным и антигенным свойствам производственных штаммов микроорганизмов. В нашем исследовании целесообразным являлось определение иммуногенности или антигенности только двух штаммов – КАВ-1 и №217, в связи с тем, что только они относятся к серотипу А1 и обладают вирулентными свойствами. Сложность выполнения данного этапа исследования заключалась в биологических особенностях *M. haemolytica* и невосприимчивости к нему лабораторных животных, не позволяющей производить их заражение без предварительной иммуносупрессии, по ранее разработанной нами схеме. Использование линий иммунодефицитных животных SCIDBEIGE является экономически затратным, ввиду чего данные животные не использовались в дальнейших опытах.

Для решения поставленной задачи нами была рассмотрена возможность контроля эффективности разрабатываемого препарата не по показателю иммуногенности, а путём контроля антигенной активности на морских свинках.

Для опыта было сформировано три группы морских свинок, по 5 голов в каждой, из которых первая группа была иммунизирована моновакциной, изготовленной из штамма *M. haemolytica* КАВ-1, вторая группа была вакцинирована монопрепаратом из штамма *M. haemolytica* №217, третья группа являлась контрольной, в которой животным вводился стерильный физиологический раствор в соответствующем объёме. Препараты были выполнены на гидроксиде алюминия (ГОА). Введение препарата опытными группами животных проводили двукратно с интервалом 21 день подкожно в объёме 1 см³, концентрация бактериальных клеток в 1 см³ составила 6 млрд. мкр. кл. Выбор данного адъюванта для контроля антигенной активности был случайный, так как цель исследования стояла в сравнении антигенной активности двух штаммов, а не в стремлении усиления антигенности путём целенаправленного подбора адъюванта.

Принцип подготовки и постановки реакции агглютинации:

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

2. получение соматического антигена *Mannheimia haemolytica*, было выполнено аналогичным методом, что при постановке реакции непрямой гемагглютинации, но с некоторыми изменениями. Так, бульонную культуру подвергали термической инактивации при 60 °С при экспозиции 30 минут. Для отделения супернатанта инактивированная нагреванием бактериальная масса была подвергнута центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 минут. После окончания операции надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали в 25 см³.

физиологического раствора до достижения концентрации 2 млрд. мкр. кл. в 1 см³. с последующим инкубированием при 37 °С в течение 12 часов. После термостатирования суспензию повторно центрифугировали, надосадочную жидкость сливали, а осадок последовательно промывали в PBS при pH 5,0, 6,0 и 7,0 соответственно. После сделанных манипуляций доводили концентрацию соматического антигена до 2 млрд. мкр. кл. в 1 см³, с использованием PBS при pH 7,0;

3. постановку реакции агглютинации осуществляли следующим образом: из сывороток готовили последовательные разведения 1:25-1:3200. Затем сыворотку переносили в серологические пробирки в объёме 0,5 см³ каждого разведения. К каждому разведению сыворотки добавляли рабочую дозу антигена в том же объёме. После смешивания с антигеном, разведение сыворотки удваивали. Пробирки встряхивали до равномерного смешивания жидкостей и инкубировали в термостате в течение 24 часов, а после выдерживали в бытовом холодильнике при температуре от 4 до 8 °С в течение 12 часов.

Параллельно ставили контроль самоагглютинации антигена *Mannheimia haemolytica*. Так, к соматическому антигену добавляли физиологический раствор в равном объёме. Самоагглютинация должна отсутствовать.

Отрицательным контролем служили сыворотки крови, полученные от животных до момента начала проведения опыта, то есть до первой вакцинации. Отрицательные сыворотки не должны агглютинировать с антигеном.

РА оценивали в крестах по 4-х балльной системе.

Реакцию учитывали только при четких показателях всех контролей, результаты опыта приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Результаты опыта по определению антигенной активности штаммов манхемий в реакции агглютинации в отношении соматического антигена *Mannheimia haemolytica* (n=15)

Заражающая культура	Титры антител с оценкой два креста и выше в сыворотке крови морских свинок	
	После первой вакцинации	После второй вакцинации
1	2	3
M. haemolytica KAB-1 (n=5)	1:200	1:800
	1:400	1:800
	1:400	1:800
	1:400	1:1600
	1:400	1:800
Среднее значение	1:360	1:960

1	2	3
M. haemolytica №217 (n=5)	1:400	1:800
	1:100	1:800
	1:200	1:800
	1:200	1:400
	1:400	1:800
Среднее значение	1:260	1:720

Как видно из результатов, приведённых в таблице 10 средний титр антител у животных подвергшихся первой иммунизации антигеном M. haemolytica КАВ-1 составил 1:360, в то время как значение данного показателя для штамма M. haemolytica №217 составило 1:260. Повторная иммунизация антигеном M. haemolytica КАВ-1 позволила увеличить титры антител до 1:960, в то время как значение аналогичного показателя для антигена M. haemolytica №217 составило 1:720. У всех животных контрольной группы, которым вводился физиологический раствор, на всех этапах проведения опыта не было обнаружено титров антител к антигену Mannheimia haemolytica. Аналогичная ситуация наблюдалась при исследовании в реакции агглютинации сыворотки крови, полученной от опытных животных до первой иммунизации.

Из полученных данных можно сделать заключение, что штамм M. haemolytica КАВ-1 обладает большей антигенной активностью для морских свинок после однократной и двукратной иммунизации, ввиду чего становится логичным выбор штамма КАВ-1 для использования в качестве производственного.

4.8. Отбор и депонирование производственного штамма Mannheimia haemolytica

Штаммы M. haemolytica КАВ-1 и №217 были паспортизированы и депонированы в музее типовых культур ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко как контрольно-производственные культуры. Все остальные эпизоотические изоляты были паспортизированы и помещены на хранение в музей организации как коллекционные для дальнейшего изучения.

В ходе проведения депонирования все, приведённые в паспорте, свойства контрольно-производственных культур были комиссионно подтверждены и оформлены в акте комиссионных испытаний.

С целью последующей регистрации биопрепарата производственный штамм КАВ-1 был дополнительно депонирован в государственной коллекции ФБУН «ГНЦ ПМБ» под названием «КЛ-ВИЭВ» с регистрационным номером В8139 от 25.07.2017 после предварительного подтверждения принадлежности депонируемой культуры к виду *Mannheimia haemolytica* методом секвенирования участка гена 16S рРНК.

После официального депонирования штамма как производственного был разработан стандарт организации СТО 00496165-0003-2017 – Производственные и контрольные штаммы *Mannheimia haemolytica* (метод изготовления и контроля посевных материалов), используемый потенциально для внедрения в производство [приложение 5].

4.9. Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота

Оптимизация методов культивирования бактерий вида *Mannheimia haemolytica* в лабораторных и промышленных условиях

Для получения экспериментальных серий препарата, содержащего антиген *Mannheimia haemolytica*, был проведен опыт по подбору оптимального состава питательных сред и условий для глубинного культивирования, обеспечивающих максимальное накопление бактериальной массы на единицу объёма с соответствующим экономическим выходом. Таким образом, первым опытом данного этапа стал подбор сред для глубинного культивирования, вторым опытом стало определение оптимальных условий культивирования при использовании бутылей в лабораторных условиях и промышленного биореактора в производственных условиях.

При подборе бульонных питательных сред были использованы следующие коммерческие позиции: эугоник бульон (М429 Himedia), триптон-соевый бульон

(M011 Himedia), сердечно-мозговой бульон (M210 Himedia), бульон Хоттингера (M1425 Himedia), а также бульон Хоттингера некоммерческого производства, изготовленного ООО «Ветбиохим».

Приготовление питательных сред коммерческого изготовления было выполнено в полном соответствии с действующей инструкцией производителя. Приготовление бульона Хоттингера в условиях ООО «Ветбиохим» по общепринятой технологии, описанной в приложении 6 «Промышленный технологический регламент на производство и контроль вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак».

Суть запланированного опыта по подбору сред заключалась в том, что во флаконы, содержащие различные питательные среды одинакового объёма (250 мл) было внесено по 25 мл бульонной культуры *Mannheimia haemolytica* (из расчёта 1:10), выращенной на мясопептонном бульоне (M002 Himedia) в концентрации 1 млрд. мкр. кл. см³. Ввиду того, что для культур *Mannheimia haemolytica* оптимальным значением pH при глубинном культивировании является диапазон 7,2-7,8, а субоптимальным значения $\leq 7,1$ и $\geq 7,9$, то значение pH всех приготовленных коммерческих и не коммерческих сред, используемых в опыте, было оптимизировано до 7,5 (среднее значение) благодаря внесению щёлочи. В последующем флаконы были помещены в термостат для культивирования в течение 24 часов при 37 °С. Каждые 2 часа производился отбор 5 мл содержимого флаконов для определения концентрации по оптической плотности. Результаты приведены в таблице 11.

Таблица 11 - Концентрация бактериальной массы *Mannheimia haemolytica* выращенной глубинным методом в бутылках с использованием различных питательных средах

Длительность культивирования		Питательная среда				
		Эугоник бульон	Триптон-соевый бульон	Сердечно-мозговой бульон	Бульон Хоттингера (Himedia)	Бульон Хоттингера (ООО «Ветбиохим»)
		Первоначальное значение pH при приготовлении				
		7,0 ± 0,2	7,3 ± 0,2	7,4 ± 0,2	7,4±0.2	7,5±0.2
2 часа	Концентрация бактерий	6,5*10 ⁷	6,4*10 ⁷	6,7*10 ⁷	6,8*10 ⁷	6,1*10 ⁷
4 часа		7,3*10 ⁷	7,6*10 ⁷	8,1*10 ⁷	7,4*10 ⁷	7,3*10 ⁷
6 часов		8,4 *10 ⁷	9,1*10 ⁷	9,9*10 ⁷	8,8*10 ⁷	9,8*10 ⁷
8 часов		1,3*10 ⁸	1,7*10 ⁸	1,6*10 ⁸	1,5*10 ⁸	1,9*10 ⁸

10 часов		$3,8 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$
12 часов		$6,4 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^8$	$7,6 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,4 \cdot 10^8$
14 часов		$1,2 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$
16 часов		$2,5 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^9$	$3,2 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^9$
18 часов		$2,7 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^9$	$3,3 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$
20 часов		$2,7 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^9$	$3,3 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$
22 часа		$2,7 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^9$	$3,3 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$
24 часа		$2,7 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^9$	$3,3 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$

Как видно из приведённых данных, наибольшая концентрация бактериальной массы *Mannheimia haemolytica* при глубинном культивировании на бутылках достигается с использованием сердечно мозгового бульона, при этом концентрация не превышает 3,3 млрд. мкр. клеток. Наименьшая концентрация при культивировании наблюдается с использованием некоммерческого бульона Хоттингера и составляет 1,8 млрд. мкр. клеток. Иными словами, при использовании сердечно-мозгового бульона для культивирования клеток манхемий в лабораторных условиях достигнутая концентрация в 1,8 раз превышает значение аналогичного показателя для бульона Хоттингера, изготовленного на биопредприятии. Наглядно тенденция изменения концентрации бактериальной массы графически приведена на рис. 17.

Для достижения максимальной концентрации бактериальной массы после получения отливки демонстрирующей существенное снижение значения концентрации водородных ионов в кислую сторону, а также для поддержания углеводного питания микроорганизмов 1-раз в 5 часов производилось внесение в бульонную культуру 40%-ного раствора глюкозы (из расчёта 1,25 мл глюкозы на 250 мл среды) и 10 %-ного раствором едкого натра до достижения значения pH 7,5. Существенным снижением pH считалось уменьшение значения данного показателя до субоптимальных, то есть до 7,1 и ниже.

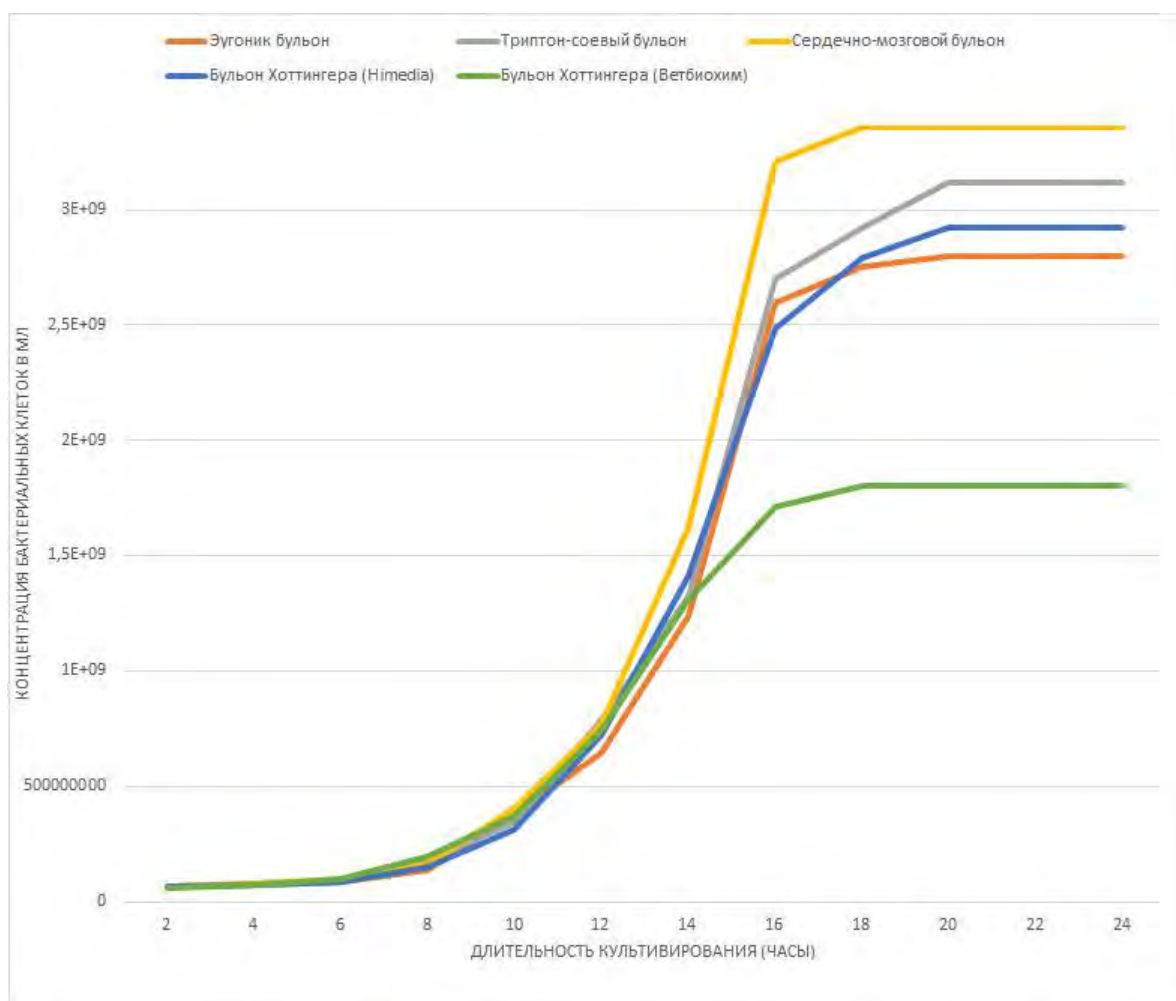


Рисунок 17 - График зависимости концентрации бактериальной массы *Mannheimia haemolytica* при глубинном культивировании на бутылках от длительности культивирования и от различных питательных сред

На графике, представленном на рисунке 17 видно, что кривые накопления бактериальных клеток манхемий с использованием различных сред очень схожи, что объясняется ростовыми свойствами микроорганизма и использованием для опыта идентичных по назначению питательных сред. Тем не менее, использование сердечно-мозгового бульона позволяет достичь максимальной концентрации бактериальных клеток в единице объема питательной среды. Дополнительно стоит отметить, что при культивировании манхемий фаза физиологического приспособления (лаг – фаза) весьма длительная и составляет около 6-8 часов. Продолжительность экспоненциальной фазы при культивировании в бутылках продолжалась 10 часов.

Реализованный опыт позволяет обосновать использование сердечно-мозгового бульона для получения небольших экспериментальных серий биопрепаратов, но не в случае промышленного биопроизводства. В первую очередь, это связано с тем, что коммерческие среды существенно дороже, чем те, что готовятся непосредственно на биопредприятии. Так на август 2017 года стоимость реализуемых на Российском рынке питательных сред приведена в таблице 12.

Таблица 12 - Расчёт себестоимости использования различных питательных сред для культивирования манхемий.

Показатели	Питательная среда				
	Эугоник бульон	Триптон-соевый бульон	Сердечно-мозговой бульон	Бульон Хоттингера (Himedia)	Бульон Хоттингера (Ветбиохим)
Стоимость упаковки	5434	4011	5454	5648	-
Масса среды в упаковке	500	500	500	100	-
Количество грамм среды на 1 литр воды	29,4	30	37	23	-
Объём среды из 1 упаковки (литров)	17	16,6	13,5	4,3	-
Стоимость 1 литра среды	319 р.	241,6 р.	404 р.	1313,4 р.	87 р.

Как видно из данных таблицы №12, использование сердечно-мозгового бульона в условиях промышленного производства является экономически нецелесообразным ввиду высокой стоимости. Фабрично приготовленный бульон Хоттингера в 4,6 раза дешевле сердечно-мозговой среды.

Определившись с тем, что в лабораторных условиях для накопления бактериальной массы *Mannheimia haemolytica* целесообразно использовать сердечно-мозговую среду, именно она была использована для дальнейших исследований, т.е. для отработки технологии накопления бактериальной массы на бутылках.

Технологический процесс культивирования в бутылках заключался в предварительной подготовке питательных сред и посевного материала по схеме приведённом на рисунке 18.

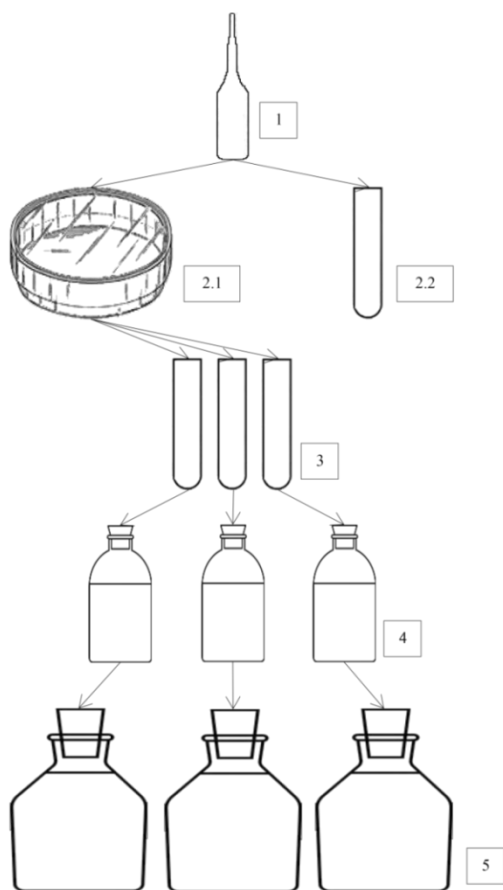


Рисунок 18 - Технологическая схема культивирования клеток *Mannheimia haemolytica* в бутылках

Так, в первый день проводили подготовку первой генерации культуры *Mannheimia haemolytica* путём посева в пробирку с МПБ и агаризированную среду; на второй день проводилось подтверждение культуральных, морфологических и тинкториальных свойств и получали вторую генерацию штамма в пробирках с бульонными средами; на третий, после предварительного контроля раскладки, производили пересев всего объёма пробирки, во флакон, содержащий 250 мл питательной среды; на четвёртый день производили пересев всего объёма флакона с бульонной культурой на бутылки. Во всех случаях культивирование продолжалось в течение 18-24 часов при температурном режиме 37 °С.

В ранее проведённом опыте было установлено, что для получения антигена *Mannheimia haemolytica* возможным является использование триптон-соевого бульона, сердечно-мозговой среды и бульона Хоттингера. При этом было зафиксировано, что длительность культивирования микроорганизмов с момента засева матровой раскладки до наступления стационарной фазы весьма длительное и составляет 16 часов. С целью сокращения данного периода, а также для увеличения концентрации бактериальных клеток при культивировании, логичным является создание условий, при которых возникает возможность ускоренного размножения за счёт непрерывного помешивания, введение в питательную среду дополнительных веществ, ускоряющих размножение, в частности, аминокислот, дрожжевого экстракта, витаминов, микроэлементов.

Для проведения контролируемого накопления бактериальной массы проводили культивирование при постоянном помешивании содержимого бутылей на

шейкере Innova 2000 помещённом в термостат. Шейкер работал при 70-80 оборотах в минуту.

Для поддержания необходимого уровня питательных веществ в среде проводилось добавление 40 %-ного раствора глюкозы из расчёта 0,5 % к объёму культивируемой массы 1 раз в 5 часов. Ввиду того, что оптимальное значение показателя pH для *Mannheimia haemolytica* находится в диапазоне 7,2-7,8, нашей задачей являлось отслеживание данного показателя и его выравнивания в данный диапазон путём добавления 10 %-ного раствора щёлочи (NaOH). Особое внимание было обращено на то, что внесенная в среду глюкоза приводила к естественному снижению значения показателя pH, поэтому отливка образца для pH-метрии проводилась после внесения глюкозы, а не до этой манипуляции. Дополнительно было внесено 5 %-дрожжевого экстракта, 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота и четверть флакона добавки Naemophilus Growth Supplement FD117. Использование компонента FD117 было обосновано тем, что на твёрдой питательной среде, содержащую добавку, микроорганизм демонстрировал лучший рост, по сравнению со средами, не содержащими добавку.

Предложенная схема позволила достичь концентрацию бактериальной массы, равной 6,8 млрд. мкр. кл. см³, что в 2,1 раза больше ранее полученных результатов. Более подробно результаты исследования приведены в таблице 13 и на рисунке 19.

Таблица 13 - Концентрация бактериальной массы *Mannheimia haemolytica* в зависимости от продолжительности культивирования

Режим	Продолжительность культивирования											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
С помещиванием	9,1*1 0 ⁷	1,7*1 0 ⁸	3,5*1 0 ⁸	7,3*1 0 ⁸	1,5*1 0 ⁹	3,2*1 0 ⁹	6,8*1 0 ⁹	7,0*1 0 ⁹	7,0*1 0 ⁹	7,0*1 0 ⁹	7,0*1 0 ⁹	7,0*1 0 ⁹
Без помещивания	6,7*1 0 ⁷	8,1*1 0 ⁷	9,9*1 0 ⁷	1,6*1 0 ⁸	4,0*1 0 ⁸	7,6*1 0 ⁸	1,6*1 0 ⁹	3,2*1 0 ⁹	3,3*1 0 ⁹	3,3*1 0 ⁹	3,3*1 0 ⁹	3,3*1 0 ⁹

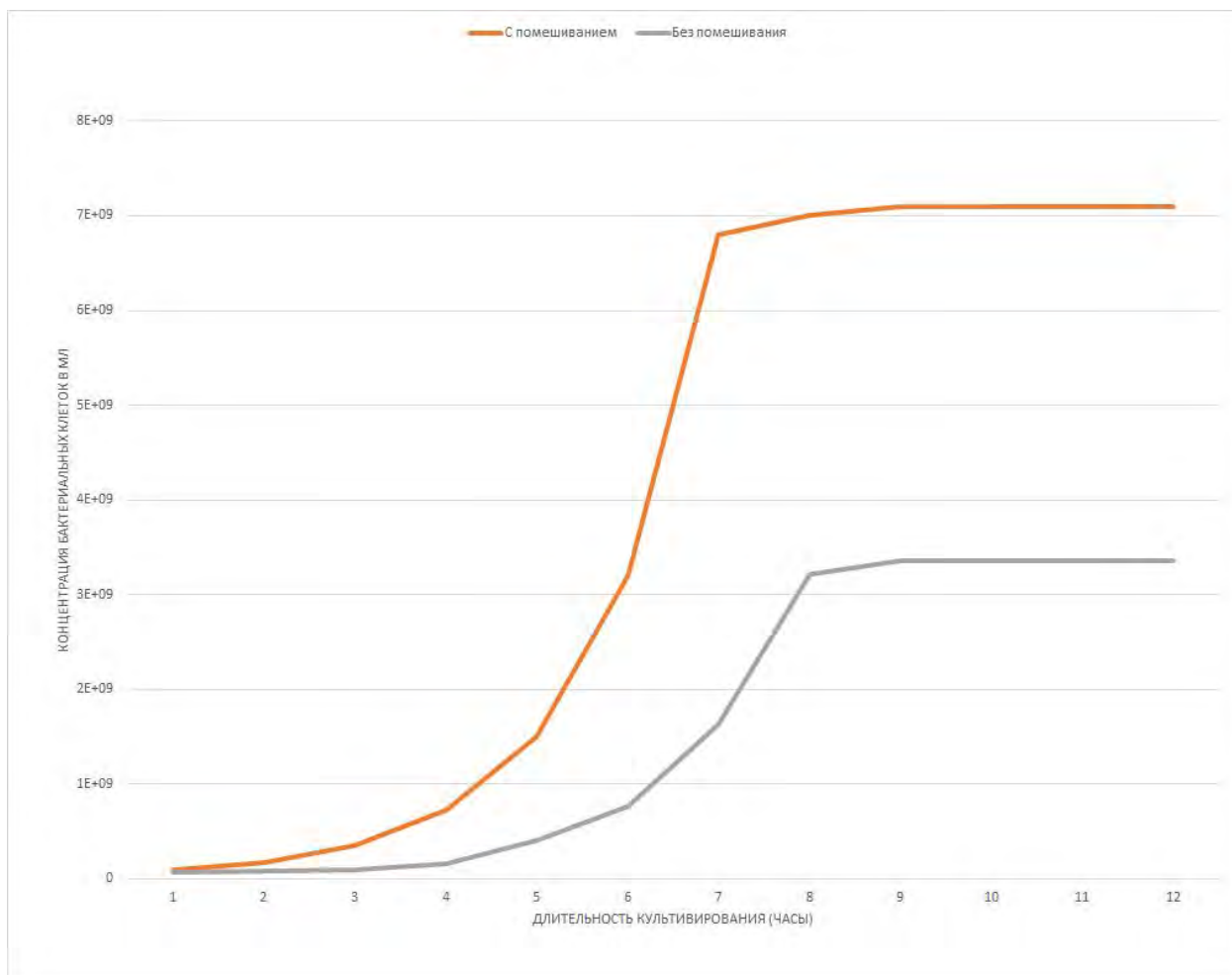


Рисунок 19 - Концентрация бактериальной массы *Mannheimia haemolytica*, выращенной на сердечно-мозговом бульоне глубинным методом в бутылках с использованием шейкера для постоянного помешивания *

* для сравнения на график дополнительно вынесены ранее полученные данные по определению концентрации бактериальных клеток при культивировании на сердечно-мозговой среде без постоянного помешивания.

Согласно данным, приведённым в таблице 13 и рис. 19, постоянное помешивание на шейкере при культивировании манхемий позволило сократить экспоненциальную фазу при увеличении конечной концентрации бактериальной массы в 2,1 раза.

Отработка технологии накопления бактериальной массы с использованием промышленного реактора

В ранее проведённых опытах была установлена экономическая целесообразность использования бульона Хоттингера для получения антигена *Mannheimia*

haemolytica в условиях промышленного производства. Изготовление среды происходило согласно рецептуре.

Подготовка посевного материала проводилась аналогично ранее описанной схеме (рис. 18), но в увеличенных объёмах, таким образом, чтобы конечная расплодка, вносимая в реактор, составляла не менее 1/10 части его объёма.

Непосредственно после внесения в реактор матровой расплодки добавляли дрожжевой экстракт из расчёта 5 % к общему объёму, глюкозу 40 %-ную из расчёта 0,5 %, сыворотку крови крупного рогатого скота, содержащее 5 флаконов добавки *Haemophilus Growth Supplement* FD117 растворённого в объёме 10 см³, и внесением щёлочи устанавливали значение pH 7,5. Контролируемое культивирование продолжалось до наступления момента прекращения увеличения концентрации бактериальных клеток. Результатом нескольких культивирований была бульонная культура, содержащая 12-14 млрд. мкр. кл. см³.

Бактериальная масса *Mannheimia haemolytica*, выращенная в промышленных условиях, инаktivировалась непосредственно в биореакторе в течение 72 часов путём внесения в реактор формалина, с 37%-ным содержанием формальдегида в объёме 0,3%. Во время проведения инаktivации поддерживали постоянную температуру 37 °С при постоянном помешивании 10% оборотов в минуту.

В случае получения экспериментальных образцов препарата при культивировании в бутылках, инаktivацию проводили путём внесения 0,3 % формалина от объёма инаktivированной жидкости. При этом период инаktivации составлял 3 суток в условиях термостата при 37 °С.

Контроль полноты инаktivации полученной бактериальной массы проводили по двум методам: подтверждение отсутствия живых клеток и подтверждение полноты инаktivации токсинов, полученных в процессе культивирования клеток. Первый метод заключался в подтверждении стерильности полученного антигена, выполненного в соответствии с ГОСТом 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности». В случае выявления роста любых посторонних видов микроорганизмов полученная бактериальная масса не допускалась к дальнейшему

использованию, в неё дополнительно вносился формалин, а спустя 3 дня контроль стерильности повторялся. Второй метод заключался в определении безопасности использования препарата в биологической пробе на лабораторных животных, для чего были использованы 10 белых мышей массой 16-18 гр. Данным животным подкожно вводили полученный антиген в исходной концентрации в объёме 0,5 см³. В случае, когда все 10 мышей выжили в течение 10 дней после введения препарата, антиген признавался не токсичным и мог использоваться для дальнейшей работы.

Концентрирование и очистка мангеймиевого антигена

Концентрирование клеток *Mannheimia haemolytica* в промышленных условиях проводили путём сепарирования инактивированной бульонной культуры с использованием сепаратора непрерывного действия (Alfa Laval) с производительностью от 200 литров в час.

Концентрирование небольшого объёма инактивированной бульонной культуры *Mannheimia haemolytica*, выращенной в бутылках, проводили в условиях лаборатории с использованием центрифуги Treeewe 6lr, позволяющей за один раз провести обработку 6 литров культуры. Режим центрифугирования составлял 4000 оборотов в минуту при экспозиции 30 минут, с температурой +4 °С. После проведения концентрирования 90 % объёма центрифугированной жидкости декантировалось, а оставшийся объём в условиях лабораторного бокса переносили в стерильный стеклянный флакон и хранили для последующего использования.

Подбор адъюванта, определение оптимальной иммунизирующей дозы и определение способа введения препарата

Для определения оптимальной вакцинальной дозы, способной вызвать формирование напряженного иммунитета, проводили вакцинацию морских свинок вариантом пилотного препарат с разной концентрацией бактериального антигена 9×10^9 , $7,5 \times 10^9$, 6×10^9 , $4,5 \times 10^9$, 3×10^9 мкр. кл., выполненными на основе различных адъювантов. Так, для осаждения бактериальной массы были использованы сле-

дующие адъюванты: гидроксид алюминия (ГОА) в соотношении 1/9, полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ-6000) в соотношении 1/9, акрипол 971р в соотношении 1/9 и масляный адъювант Montanide ISA 70 в соотношении 1/1.

Монопрепараты, выполненные с использованием ГОА, ПЭГ-6000 и акрипола 971р, были получены путём тщательного смешивания адъюванта с антигеном в указанном соотношении. Изготовление серии препарата с использованием масляного адъюванта выполнялось посредством эмульгирования антигена, с использованием мобильного производственного модуля (МПМ) ЮВС-Сильверсон при 5 тыс. об. /мин в течение 5 мин.

Основными критериями для оценки биопрепарата стала его безвредность и антигенная активность. Опыт был выполнен в условиях вивария Вышневолоцкого филиала ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко.

Для осуществления опыта было сформировано 40 групп морских свинок по 2 головы в каждой. Принцип формирования групп приведён в таблице 14. Животные были подобраны по принципу аналогов. От животных, участвующих в опыте, предварительно была получена сыворотка крови для определения наличия антител к соматическому антигену *Mannheimia haemolytica* в реакции агглютинации. Животных вакцинировали пилотными вариантами моновакцины двукратно с интервалом в 21 день. Перед второй вакцинацией, а также спустя 14 дней после второй вакцинации, от всех животных была получена сыворотка крови с целью определения титров антител в реакции агглютинации.

Таблица 14 - Принцип формирования опытных группы животных при определении оптимальной иммунизирующей дозы, подборе адъюванта и способа введения препарата

	Концентрация	ГОА	ПЭГ-6000	Акрипол 971р	Montanide ISA 70
	Номер группы				
Подкожно	3x10 ⁹	1	3	5	7
	4,5x10 ⁹	9	11	13	15
	6x10 ⁹	17	19	21	23
	7,5x10 ⁹	25	27	29	31
	9x10 ⁹	33	35	37	39
Внутри-мышечно	3x10 ⁹	2	4	6	8
	4,5x10 ⁹	10	12	14	16
	6x10 ⁹	18	20	22	24
	7,5x10 ⁹	26	28	30	32
	9x10 ⁹	34	36	38	40

Критерием оценки результатов опыта являлось наличие местных и системных побочных эффектов. Результаты реализованного опыта приведены в таблице 15.

Таблица 15 - Результаты подбора адъюванта для изготовления инактивированной вакцины против крупного и мелкого рогатого скота при двукратном введении

Концентрация	Группа	ГОА	Группа	ПЭГ-6000	Группа	Акрипол 971р	Группа	Montanide ISA 70
Подкожное введение								
3x10 ⁹	1	-	3	+	5	-	7	-
4,5x10 ⁹	9	-	11	+	13	-	15	-
6x10 ⁹	17	+	19	++	21	-	23	-
7,5x10 ⁹	25	+	27	+++	29	+	31	-
9x10 ⁹	33	+	35	+++	37	++	39	-
Внутримышечное введение								
3x10 ⁹	2	-	4	-	6	-	8	-
4,5x10 ⁹	10	-	12	-	14	-	16	-
6x10 ⁹	18	-	20	+	22	-	24	-
7,5x10 ⁹	26	+	28	++	30	-	32	-
9x10 ⁹	34	+	36	+++	38	-	40	-

(-) отсутствие местной и системной реакции при однократном и двукратном введении.

(+) отсутствие системной реакции, при наличии местной реакции при однократном введении.

(++) отсутствие системной реакции, при наличии местной реакции при двукратном введении.

(+++) присутствует системная и местная реакция при однократном введении.

Как видно из результатов опыта, представленных в таблице 15, препараты, выполненные на основе ГОА, ПЭГ-6000 и акрипола при подкожном способе введения, а также ГОА и ПЭГ-6000 при внутримышечном введении демонстрируют нежелательные побочные эффекты, ввиду чего данные препараты в дальнейшем не рассматривались для дальнейшего изучения.

Определение антигенной активности различных вариантов препарата проводили в реакции агглютинации с сыворотками, полученными после первой и второй вакцинации от лабораторных животных предыдущего опыта. В опыте, по определению антигенной активности, использовали сыворотки крови, полученные от животных, вакцинированных препаратами на основе масляного адъюванта при подкожном и внутримышечном введении, а также акрипола 971р при внутримышечном способе инъектирования. Результаты приведены в таблице 16.

Таблица 16 - Антигенная активность вариантов препарата, выполненных с использованием различных адъювантов, при разных способах введения

Адъювант / способ введения	Концентрация мкр. кл.	Номер животного	Титры антител с оценкой два креста и выше в сыворотке крови морских свинок			
			До вакцинации	После первой вакцинации	После второй вакцинации	Среднее значение титра антител после второй вакцинации
Акрипол 971р / внутримышечное введение	3x10 ⁹	1	0	1:200	1:400	1:400
		2	0	1:100	1:400	
	4,5x10 ⁹	1	0	1:200	1:400	1:600
		2	0	1:200	1:800	
	6x10 ⁹	1	0	1:100	1:200	1:300
		2	0	1:200	1:400	
	7,5x10 ⁹	1	0	1:100	1:400	1:400
		2	0	1:200	1:400	
	9x10 ⁹	1	0	1:200	1:400	1:600
		2	0	1:400	1:800	
Montanide ISA 70 / подкожное введение	3x10 ⁹	1	0	1:400	1:1600	1:1200
		2	0	1:200	1:800	
	4,5x10 ⁹	1	0	1:100	1:400	1:600
		2	0	1:200	1:800	
	6x10 ⁹	1	0	1:200	1:800	1:1200
		2	0	1:400	1:1600	
	7,5x10 ⁹	1	0	1:200	1:1600	1:1200
		2	0	1:200	1:800	
	9x10 ⁹	1	0	1:200	1:800	1:1200
		2	0	1:400	1:1600	
Montanide ISA 70 / внутримышечное введение	3x10 ⁹	1	0	1:200	1:800	1:1200
		2	0	1:400	1:1600	
	4,5x10 ⁹	1	0	1:200	1:800	1:800
		2	0	1:200	1:800	
	6x10 ⁹	1	0	1:200	1:800	1:1200
		2	0	1:400	1:1600	
	7,5x10 ⁹	1	0	1:200	1:400	1:600
		2	0	1:400	1:800	
	9x10 ⁹	1	0	1:400	1:800	1:1200
		2	0	1:400	1:1600	

Результатом проведённого опыта стало определение того, что наибольшей антигенной активностью обладает препарат, выполненный на основе масляного адъюванта Montanide ISA 70 с содержанием бактериального антигена 3 млрд. мкр. кл. в 1 см³ при подкожном и внутримышечном способе введения, средний титр антител после двукратной вакцинации, к которым составил 1:1200. Увеличение содержания антигена в иммунизирующей дозе не приводит к существенному возрастанию титра антител. Аналогичный результат был получен при использовании вариантов монопрепарата с более высокой концентрацией содержания бактери-

альных клеток, например в случае иммунизации животных эмульгированными препаратами с содержанием 6×10^9 и 9×10^9 мкр. кл. см³.

Поскольку в реализованном опыте была установлена одинаковая антигенная активность препарата, выполненного с использованием масляного адъюванта при подкожном и внутримышечном введении, окончательный выбор метода введения препарата был установлен посредством испытания препарата в условиях скотоводческих и овцеводческих предприятий.

Технологическая схема изготовления инактивированной вакцины против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота

После обоснования оптимальной иммунизирующей дозы мангеймиозного антигена для крупного и мелкого рогатого скота, а также целесообразности использования масляного адъюванта Montanide ISA 70, была разработана технологическая схема изготовления инактивированной вакцины. Этапы производственного цикла вакцины инактивированной против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота приведены на рисунке 20.

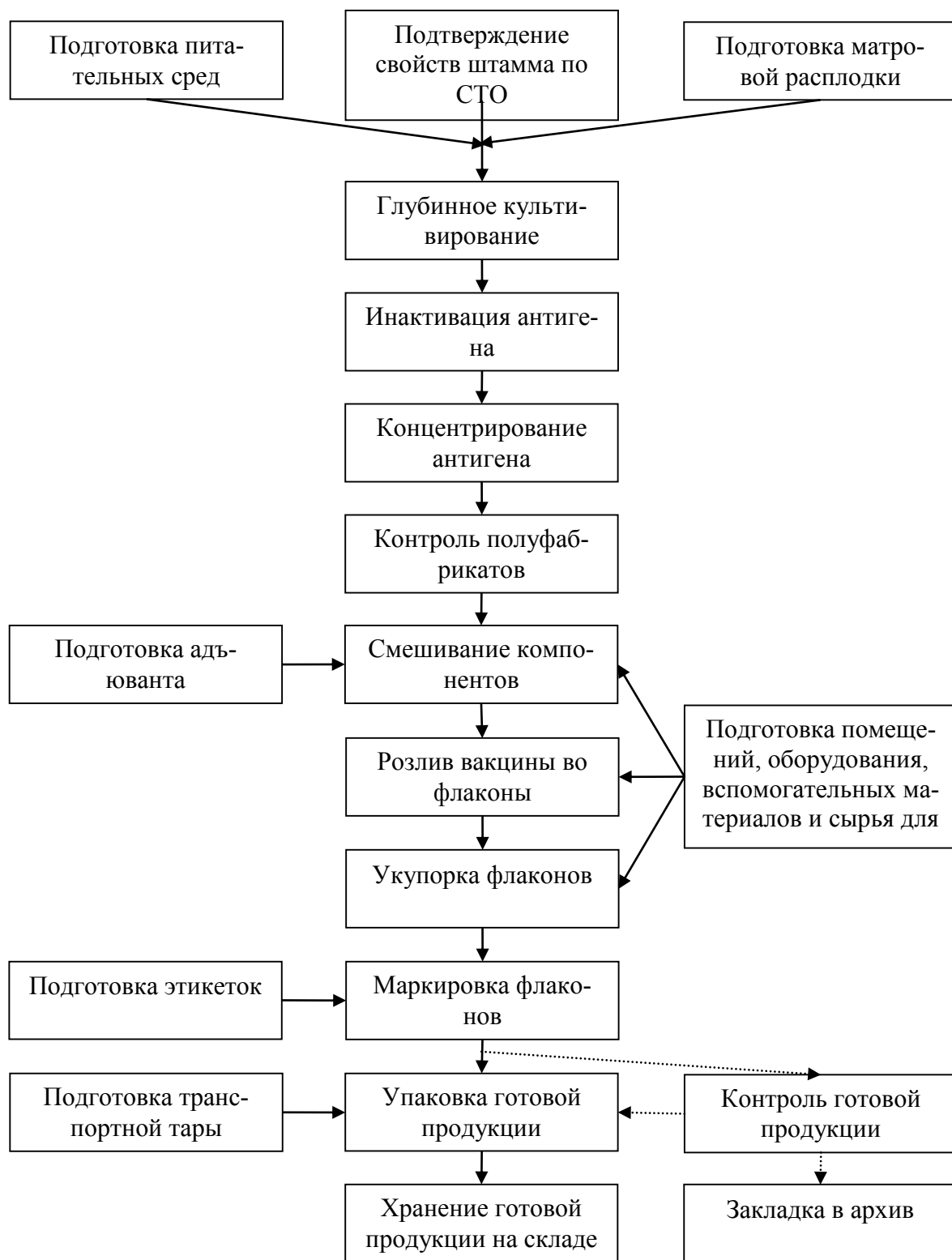


Рисунок 20 - Технологическая схема производства вакцины инактивированной против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота

При компоновке серии вакцины «Манхемвак» против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота не было необходимости объединения различных антигенов, ввиду того, что разработанная вакцина является монопрепаратом. Тем не

менее, в качестве дополнительных компонентов вакцина содержит мертиолят из расчёта 1:10000 в качестве консерванта для многодозовых фасовок препарата и натрий гидроксид для стандартизации концентрации водородных ионов конечного препарата, который был установлен на уровне 7,2.

При разработке технологической схемы производства биопрепарата ему было присвоено наименование «Вакцина против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированная эмульгированная «Манхемвак».

Экспериментальные серии вакцины, полученные в лабораторных условиях Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, расфасовывали в стерильных условиях вручную, в стерильные стеклянные флаконы объёмом 100,0 см³ из расчёта на 50 доз. Промышленные образцы вакцины, произведённые в ООО «Ветбиохим», фасовались в аналогичные флаконы на линии розлива данного предприятия. Использованные флаконы соответствовали техническому условию 64-2-10-87 - Флаконы из трубки стеклянной для лекарственных средств. Укупорка расфасованных флаконов производилась резиновыми пробками соответствующими ТУ 38.006108-95 - Пробки резиновые для укупоривания пенициллиновых флаконов с лекарственными средствами. Вальцовка флаконов производилась алюминиевыми колпачками соответствующими ТУ 9467-003-05749470-94 - Колпачки и прокладки алюминиевые к флаконам и бутылкам для лекарственных средств, крови и кровезаменителей. В процессе фасовки произведённого биопрепарата погрешность розлива не превышала 5 % обозначенного на флаконе объёма.

Описание всех процессов производства и контроля вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак» было приведено в разработанном и утверждённом организацией производителем технологическом регламенте [приложение 6].

4.10. Разработка методов контроля вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак»

Для проведения контроля разработанного биопрепарата согласно требованиям Федерального закона "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ были предложены и внесены в стандарт организации – СТО 00496165-0004-2017. Вакцина против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированная эмульгированная «Манхемвак» [приложение 7] со следующими критериями: внешний вид, цвет; наличие посторонней примеси трещин флаконов, нарушение маркировки, качества укупорки; концентрация водородных ионов, (pH), в пределах; стерильность; безвредность (для морских свинок); антигенная активность; стабильность эмульсии; вязкость. Подробные этапы проведения испытаний, критерии их оценки и интерпретация результатов приведены в СТО.

4.11. Изучение протективной активности экспериментальных серий вакцины на лабораторных объектах

Для исследования протективных свойств разработанного биопрепарата нами был смоделирован опыт на лабораторных объектах, демонстрирующий возможность использования экспериментальной вакцины для специфической профилактики манхеймиоза. Опыт проводили в двукратной повторяемости (при этом было изготовлено 2 экспериментальных серии препарата, выполненных в одной вариации, т.е. с использованием масляного адъюванта Montanide ISA 70 с концентрацией 3 млрд. мкр. кл. в 1 см³: экспериментальная серия вакцины «Манхемвак» № 1 и экспериментальная серия № 2).

В качестве биологической модели были использованы морские свинки массой 350-450 гр. в количестве 2-ух групп по 10 голов в каждой. Первая группа животных была опытной и подвергалась подкожной иммунизации в область холки в дозе 1 см³ двукратно с соблюдением 21-ти дневного интервала между вакцинациями. Вторая группа модельных объектов являлась контрольной и не была подвергнута вакцинации. Спустя 14 дней после второй вакцинации, морские свинки

обеих групп были подвергнуты иммуносупрессии дексаметазоном по ранее разработанной схеме, из расчёта 0,25 мл на одно введение. Затем лабораторных животных подвергали интраназальному заражению клетками *Mannheimia haemolytica* № 217 в дозе 0,2 мл. с концентрацией 5 LD₅₀ в 1 мл, т.е. 2,4 млрд. мкр. кл. в указанном объёме. В качестве заражающей культуры был выбран штамм, не используемый при производстве биопрепарата. За инфицированными животными вели наблюдение в течение 14 дней, после чего проводили усыпление и исследование патоморфологических изменений в органах и тканях с бактериологическим анализом.

При учете результатов у невакцинированных животных при патологоанатомическом вскрытии фиксировали фибринозная и серозно-фибринозная пневмонию, отёк лёгких и застой крови в лёгких при полном отсутствии данных явлений у вакцинированных животных. Инфицирующая культура была выделена в 9 из 10 случаях у невакцинированных животных, от вакцинированных морских свинок бактерии *Mannheimia haemolytica* ни в одном случае выделены не были.

4.12. Определение безопасности применения биопрепарата

Безопасность применения пилотного биопрепарата изучали при однократном и двукратном введении рекомендуемой дозы, а также дозы, двукратно превышающей рекомендуемую, животным в различном физиологическом состоянии. Серия препарата № 1 проходила клинические испытания при внутримышечном способе введения на телятах в СПА «Колхоз имени Ворошилова» г. Новоалександровск Ставропольского края и ягнятах вивария Вышневолоцкого филиала ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко, серия №2 была апробирована при подкожном способе введения на телятах в ЗАО "Племрепродуктор "Васильевское" Сергиево-Посадского района Московской области и козлятах в ООО «Колхоз Гжельский» Раменского района Московской области [приложения 9, 10, 11, 12].

Для проведения клинических испытаний в условиях животноводческих предприятий была разработана временная инструкция по применению вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной

эмульгированной [приложение 8].

Поскольку в ранее проведенном исследовании на ограниченном количестве восприимчивых животных было зафиксировано, что препарат одинаково безвреден при внутримышечном и подкожном способе введения с равной антигенной активностью, то окончательный выбор способа его инъектирования был установлен лишь после проведения повторного исследования на большой группе естественно восприимчивых животных.

Основные условия проведения клинических испытаний препарата приведены в таблице 17.

Таблица 17 - Принцип проведения клинических испытаний «Вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак» на молодняке

Предприятие (вид восприимчивых объектов)	Опытная группа (голов)	Контрольная группа (голов)	Возраст при первой вакцинации (дней)	Возраст при второй вакцинации (дней)	Доза первого введения ясм^3	Доза второго введения ясм^3	Серьезные последствия применения
Безвредность для молодняка при однократном применении вакцины в рекомендованной дозе							
«Колхоз имени Ворошилова» (телята)	30	4	7-10	-	2	-	Отсутствуют
«Племрепродуктор Васильевское» (телята)	42	4	7-10	-	2	-	Отсутствуют
«Виварий ВИЭВ» (ягнята)	4	2	7-10	-	2	-	Отсутствуют
«Колхоз Гжельский» (козлята)	12	12	7-10	-	2	-	Отсутствуют
Безвредность для молодняка при двукратном применении в рекомендованной дозе							
«Колхоз имени Ворошилова» (телята)	30	4	7-10	28-31	2	2	Отсутствуют
«Племрепродуктор Васильевское» (телята)	42	4	7-10	28-31	2	2	Отсутствуют
«Виварий ВИЭВ» (ягнята)	4	2	7-10	28-31	2	2	Отсутствуют
«Колхоз Гжельский» (козлята)	12	12	7-10	28-31	2	2	Отсутствуют
Безвредность для молодняка при однократном применении в двукратной дозе							
«Колхоз имени Ворошилова» (телята)	10	4	10	-	4	-	Отсутствуют
«Племрепродуктор Васильевское» (телята)	20	2	10-16	-	4	-	Отсутствуют
«Виварий ВИЭВ» (ягнята)	2	2	10	-	4	-	Отсутствуют
«Колхоз Гжельский» (козлята)	10	2	10	-	4	-	Отсутствуют

В результате проведенных исследований нами установлено, что однократное и двукратное введение вакцины «Манхемвак» в дозе 2 см^3 , а также в дозе,

двукратно превышающей рекомендованную, – 4 см³, молодняку крупного и мелкого рогатого скота не вызывает у подопытных животных гипертермии и системных реакций на введение препарата: признаков угнетения, снижения аппетита, адинамии. При пальпации места инъекции отмечено образование отека и гиперемии кожи, которые сохранялись у животных в течение 24 - 72 часов, а затем исчезали самостоятельно. Гибели животных не фиксировали.

Клинические испытания на беременных матках: глубокостельных коровах и овцах и козах за два месяца до окота, проводили на тех же предприятиях. Принцип проведения исследования приведён в таблице 18.

Таблица 18 - Принцип проведения клинических испытаний «Вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «МАНХЕМБАК» на беременных матках

Предприятие (вид восприимчивых объектов)	Опытная группа (голов)	Контрольная группа (голов)	Первая вакцинация (дней до отёла/ окота)	Вторая вакцинация (дней до отёла)	Доза первого введения см ³	Доза второго введения см ³	Серьёзные последствия применения
Безвредность для беременных маток при однократном применении вакцины в рекомендованной дозе							
«Колхоз имени Ворошилова» (коровы)	15	1	60-55	-	3	-	Отсутствуют
«Племрепродуктор Васильевское» (коровы)	9	1	70-55	-	3	-	Отсутствуют
«Виварий ВИЭВ» (овцы)	4	1	60-55	-	2	-	Отсутствуют
«Колхоз Гжельский» (козы)	10	1	55	-	2	-	Отсутствуют
Безвредность двукратного применения рекомендованной дозы для беременных животных							
«Колхоз имени Ворошилова» (коровы)	15	1	60-55	39-34	3	3	Отсутствуют
«Племрепродуктор Васильевское» (коровы)	9	1	70-55	49-34	3	3	Отсутствуют
«Виварий ВИЭВ» (овцы)	4	1	60-55	39-34	2	2	Отсутствуют
«Колхоз Гжельский» (козы)	10	1	55	34	2	2	Отсутствуют
Безвредность однократного применения двукратной дозы для беременных животных							
«Колхоз имени Ворошилова» (коровы)	15	1	60-55	-	6	-	Отсутствуют
«Племрепродуктор Васильевское» (коровы)	9	1	70-55	-	6	-	Отсутствуют
«Виварий ВИЭВ» (овцы)	4	1	60-55	-	4	-	Отсутствуют
«Колхоз Гжельский» (козы)	10	1	55	-	4	-	Отсутствуют

При определении безвредности препарата для беременных животных изменение клинического статуса не выявляли. Температура тела оставалась в пределах физиологической нормы, отмечено повышение значения данного показателя на 0,6±0,12 °С у коров и 0,5±0,22 °С у мелкого рогатого скота через 6 часов после

вакцинации, которое нивелировалось в течении 24 часов. Проведение пальпации позволяло обнаружить образование небольшой отёчности в области инъекции с повышением местной температуры и незначительной болезненностью, которые проходили 24 часов. Отёк полностью рассасывался в течение 7 суток. После повторной вакцинации проявления были аналогичными.

После единократного введения двойной дозы у некоторых животных опытных групп было замечено снижение подвижности. При этом у всех животных образовался небольшой отёк в области инъекции, рассасывавшийся в течение 5-7 суток, с повышением местной температуры, самостоятельно нормализующейся в течение 24 часов. Иных признаков развития общих и местных реакций на введение экспериментальной вакцины в двойной дозе зафиксировано не было.

Реализованные опыты подтвердили безвредность разработанного препарата на целевых видах животных при подкожном и внутримышечном способе введения.

4.13. Антигенная активность биопрепарата на естественно восприимчивых видах животных

Опыты по определению антигенной активности вакцины «Манхемвак» проводились в условиях скотоводческих и овцеводческих предприятий РФ, а также на овцах находящихся в виварии Вышневолоцкого филиала ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко с использованием двух серий препарата, выполненном на масляном адъюванте Montanide ISA 70, концентрация бактериальных клеток в каждой серии составила 3 млрд. мкр. кл. в 1 см³.

Для реализации опыта в каждом предприятии были сформированы группы животных по 10 голов в каждой. Оценку антигенной активности вакцины «Манхемвак» проводили путем постановки реакции агглютинации с определением титра антител к соматическому антигену *Mannheimia haemolytica*.

Результаты определения антигенной активности «Вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота «Манхемвак» инактивированной эмульгированной» при различных способах введения приведены в таблице 19.

Таблица 19 - Результаты опыта по определению антигенной активности вакцины «Манхемвак» серии №1 и №2 при внутримышечном и подкожном введении КРС и МРС

Период получения сыворотки крови	Титры антител с оценкой два креста и выше в сыворотке крови коров										Средний титр
Серия №1, внутримышечное введение, КРС, СПА «Колхоз имени Ворошилова»											
Номер животного	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-
До вакцинации	0	1:25	1:25	0	0	0	0	0	0	0	-
После первой вакцинации	1:100	1:200	1:100	1:400	1:200	1:100	1:200	1:400	1:200	1:100	1:200
После второй вакцинации	1:800	1:400	1:800	1:400	1:800	1:800	1:400	1:1600	1:400	1:800	1:720
Серия №2, подкожное введение, КРС, ЗАО "Племрепродуктор "Васильевское"											
Номер животного	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-
До вакцинации	0	0	0	0	0	1:50	0	0	0	1:25	-
После первой вакцинации	1:400	1:400	1:400	1:200	1:400	1:200	1:400	1:400	1:400	1:200	1:320
После второй вакцинации	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:800	1:800	1:1600	1:1600	1:1600	1:800	1:1360
Серия №1, внутримышечное введение, МРС, виварий ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко											
Номер животного	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-
До вакцинации	1:25	1:50	1:25	0	1:25	0	0	1:25	0	1:25	-
После первой вакцинации	1:200	1:400	1:200	1:200	1:400	1:200	1:200	1:200	1:400	1:200	1:260
После второй вакцинации	1:400	1:1600	1:800	1:800	1:800	1:400	1:400	1:800	1:1600	1:400	1:800
Серия №2, подкожное введение, МРС, ООО «Колхоз Гжельский»											
Номер животного	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-
До вакцинации	1:50	0	1:25	0	1:25	1:25	0	0	1:50	0	-
После первой вакцинации	1:400	1:400	1:50	1:400	1:400	1:200	1:400	1:100	1:200	1:400	1:295
После второй вакцинации	1:1600	1:800	1:400	1:1600	1:1600	1:800	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1080

Как видно из данных, представленных в таблице №19, титры антител к соматическому антигену *Mannheimia haemolytica* у подопытных животных изначально были практически на нулевом уровне. Поскольку при постановке реакции агглютинации разведения сыворотки начинались с разведения 1:25, более низкий уровень антител не определялся.

Первичная внутримышечная иммунизация телят вакциной «Манхемвак» способствовала образованию антител на уровне 1:100 – 1:400 с оценкой на два креста и выше, среднее значение титров антител после первой вакцинации составило 1:200, повторная вакцинация вызвала образование антител на уровне 1:400 - 1:1600, со средним значением 1:720.

Первичная подкожная иммунизация молодняка крупного рогатого скота вакциной «Манхемвак» способствовала образованию антител на уровне 1:200 – 1:400 с оценкой на два креста и выше, среднее значение титров антител после первой вакцинации составило 1:320, повторная вакцинация вызвала образование антител на уровне 1:800 - 1:1600, со средним значением 1:1360.

Первичная внутримышечная иммунизация ягнят вакциной «Манхемвак» способствовала образованию антител на уровне 1:200 – 1:400 с оценкой на два креста и выше, среднее значение титров антител после первой вакцинации составило 1:260, а повторная вакцинация вызвала образование антител на уровне 1:800 - 1:1600, со средним значением 1:800.

Первичная подкожная иммунизация молодняка мелкого рогатого скота вакциной «Манхемвак» способствовала образованию антител на уровне 1:50 – 1:400 с оценкой на два креста и выше, среднее значение титров антител после первой вакцинации составило 1:295, а повторная вакцинация вызвала образование антител на уровне 1:800 - 1:1600, со средним значением 1:1080.

Интерпретация полученных результатов позволяет сделать заключение о том, что наилучший антигенный ответ при вакцинации крупного и мелкого рогатого скота наблюдается при подкожном способе введения препарата.

5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Респираторные болезни сельскохозяйственных животных и птиц причиняют большой экономический ущерб сельскохозяйственным предприятиям. Так, в нашей стране, среди респираторных болезней крупного и мелкого рогатого скота одно из ведущих мест принадлежит пастереллёзу, возбудителем которого до недавнего времени считались виды *Pasteurella multocida* и *Pasteurella haemolytica* [33, 36]. Реклассификация последнего в отдельный род – *Mannheimia* обозначила принципиальные структурные и биологические особенности возбудителя, которые требуют дополнительного изучения и обуславливают нозологические особенности манхемия-инфекции, требующие отдельных диагностических, терапевтических, профилактических и противоэпизоотических подходов. По нашему мнению положение, когда одно инфекционное заболевание имеет несколько возбудителей разных видов и родов с разной патогенностью и видовой адаптивностью, осложняет проведение лечебно-профилактических мероприятий на практике. Так, в случае выявления одного из этих возбудителей устанавливается диагноз пастереллёз, на лечение и профилактику которого в последующем затрачиваются

трудовые и финансовые ресурсы со стороны предприятия, не приводящие к эффективному результату. Проблема в этом случае заключается в том, что препараты специфической профилактики и специфической этиотропной терапии, содержащие лишь компонент *Pasteurella multocida* не способны защитить животного от заболевания, вызванного *Mannheimia haemolytica*, и, наоборот, в виду того, что эти виды не обладают перекрёстной антигенной активностью [24]. На основании приведенных доводов, а также особенностей свойств бактериального агента *Mannheimia haemolytica* и ряда эпизоотических, клинических, патологоанатомических проявлений инфекционного процесса при манхемия-инфекции, нами предложено обособление заболевания, вызванного *M. haemolytica*, в манхеймиоз [101]. Сам термин «манхеймиоз» ранее локально упоминался в российских информационных источниках, в частности, в отчете «Роль и место Федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ») в разработке и создании перспективных средств диагностики и специфической профилактики в Российской Федерации» за 2013 год в контексте перечня диагностируемых ФГБУ «ВНИИЗЖ» инфекционных заболеваний, что в свою очередь подчёркивает интерес к данной нозологической единице в других ведущих профильных учреждениях страны и подчёркивает целесообразность обособления новой нозологической единицы [31]. Кроме того, в ряде зарубежных стран данное заболевание уже достаточно давно упоминается обособленной нозологической единицей и имеет наименование *mannheimiosis* [72, 119].

Рассматриваемый в диссертационной работе вид бактерий ранее уже изучался в нашей стране как *Pasteurella haemolytica*, но сведения о свойствах данного агента и особенностях болезни, им вызываемой, в отечественной литературе – недостаточны [26, 30]. В частности, до настоящего момента отсутствовали описательные характеристики течения и проявления манхеймиоза, его отдельные эпизоотологические данные. Именно для возмещения недостатка знаний в области манхемия-инфекции сформированы задачи настоящей работы, одновременно рассматривающей физико-биологические особенности бактериального агента *Mannheimia haemolytica*, эпизоотические данные болезни, характер клинико-

морфологических проявлений инфекционной патологии у восприимчивых сельскохозяйственных животных, особенности схемы диагностики заболевания, в том числе лабораторной, обоснование целесообразности проведения специфической профилактики, технологическую схему изготовления биопрепарата для иммунопрофилактики манхеймиоза и методов контроля пилотной вакцины.

Одной из первостепенных задач настоящей работы послужило изучение эпизоотических вспышек и описание клинко-морфологического проявления манхеймиоза, зафиксированного непосредственно на территории Российской Федерации. Так, из ряда сельскохозяйственных предприятий, где были зафиксированы клинические проявления респираторного инфекционного процесса, лишь в 5 случаях, был выделен изолят *Mannheimia haemolytica*, в то время как в 16 случаев была получена культура *Pasteurella multocida*. Из 5 выделенных изолятов манхеймий этиологическую значимость нами удалось доказать лишь у 2 культур, выделенных из материала скотоводческих и овцеводческих предприятий Белгородской области и Краснодарского края. В данных предприятиях нами были зафиксированы признаки, свойственными для манхеймиоза, описанные в зарубежных литературных источниках [90, 115, 134, 166]. Кроме того, нами было установлено, что клинко-морфологическое проявление манхеймиоза на территории Российской Федерации зачастую не имело каких-либо постоянных признаков, позволяющих однозначно определить заболевание без последующей лабораторной диагностики. Иными словами, клинические признаки и патологоанатомические изменения были одновременно свойственные для нескольких инфекционных патологий. Данное явление согласуется с иностранными данными, в которых это объясняется ассоциированным течением заболевания, когда признаки одного заболевания накладываются на признаки другого [86, 99, 119, 124].

Тем не менее, нами были изучены и систематизированы клинические проявления манхеймиоза у разных возрастных групп крупного и мелкого рогатого скота. В ходе исследования было установлено, что заболеванию наиболее подвержены телята в возрастной категории от 7 дней до 6-ти месяцев, а также ягнята от 7 дней до 3-х месячного возраста. Для молодняка крупного и мелкого рогато-

го скота характерными оказались лихорадка, тахикардия, тахипноэ, снижение подвижности и аппетита. Аналогичные признаки наблюдались и у взрослых животных, но преимущественно на фоне предварительного стресс-воздействия. Молодняк чаще всего проявлял клинические признаки, типичные для пастереллёза, а, именно, – сухой кашель, переходящий во влажный, обильные серозные и слизисто-серозные выделения из носовых ходов, истощение. Дополнительно совместно с легочной формой заболевания у телят была зафиксирована желудочно-кишечная форма болезни, сопровождавшаяся диареей. У некоторых ягнят диарея также была зафиксирована. В ряде случаев отмечали кератоконъюнктивит.

У взрослых животных данные клинические проявления были менее выраженными, что, с нашей стороны, интерпретировалось как подострое и хроническое течение заболевания. Описанные признаки в достаточной мере соответствуют существующим представлениям о заболевании в странах, имеющих аналогичную проблему [55, 166, 174].

При патологоанатомическом вскрытии трупов павших животных, ранее проявлявших признаки респираторных заболеваний, было отмечено превалирование случаев фибринозной бронхопневмонии как у крупного рогатого скота, так и у мелкого рогатого скота, что и воспринималось как наиболее свойственное проявление. В некоторых случаях при вскрытии обнаруживали крупозную пневмонию, сопровождавшуюся отёком лёгких и серозно-фибринозным плевритом, реже – катаральную бронхопневмонию. Такие существенные различия проявлений целесообразно обосновывать наличием предрасполагающей или совместно текущей инфекции. Эти данные согласуются с имеющимися представлениями о современной концепции респираторных болезней молодняка, сформулированной А.Н. Куриленко, В.Л. Крупальником, Н.В. Пименовым.

На основании приведённых отличий проявлений заболевания, а также ввиду особенностей возбудителя *Mannheimia haemolytica*, нами были предприняты меры по совершенствованию принципов проведения диагностики манхеймиоза, в том числе лабораторной. Основным документом, регламентирующим принцип проведения лабораторной диагностики пастереллёзов, являются «Методические указа-

ния по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц» №22-7/82, утверждённые 20 августа 1992 года. Безусловно, данный документ имеет огромную ценность для практических специалистов, но за 25 лет с момента утверждения указаний был уточнен ряд особенностей пастереллёзной инфекции. Так, при проведении практической работы по комплексной лабораторной диагностике респираторных заболеваний животных, птицы и пушных зверей нами были выявлены недостатки со стороны действующих методических указаний по диагностике пастереллёзов:

1) несоответствующая современным представлениям классификация видов бактерий рода *Pasteurella*;

2) отсутствие описания особенностей развития и проявления инфекции, вызванной *M. haemolytica*;

3) противоречивая формулировка в отношении постановки окончательного диагноза. Так, в соответствии с действующими указаниями, окончательный диагноз – пастереллёз, устанавливается только в случае выделения из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя пастереллёза, и установления ее патогенности на лабораторных животных. В случае не выявления у изолята патогенных свойств в биопrobe на лабораторных животных диагноз не может быть установлен. Однако возбудитель *M. haemolytica* способен терять и приобретать патогенные свойства. Аналогичный принцип используется при проведении пассажа микроорганизмов через организм восприимчивых животных.

Если буквально рассматривать понятие пассаж, то его проведение предусматривает многократное последовательное размножение микроорганизмов в организме животных, культуре клеток или на искусственных питательных средах с целью изменения свойств данного агента. Ввиду вышесказанного стоит принимать к вниманию приоритет диагноза «пастереллёз» во всех случаях выделения бактерий вида *Pasteurella multocida*. Конечно, данное предложение, встретит неоднозначную реакцию со стороны большинства профильных ветеринарных специалистов, а также руководителей сельскохозяйственных предприятий ввиду

необходимости наложения на предприятия ограничительных мероприятий в виде карантина в соответствии с действующей «Инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации пастереллеза сельскохозяйственных животных (с Изменением)», утверждённой Министерством сельского хозяйства СССР 15 декабря 1983 года. Как видим, действующая инструкция уже и морально, и методически устарела. Решением возникшей сложности становится разработка новой инструкции по проведению профилактических мероприятий и мер, направленных на ликвидацию пастереллёза сельскохозяйственных животных. Конечной целью данного регламента является разделение пастереллёза на эпизоотическую форму, в случае наличия патогенных свойств у выделенных на предприятии культур *Pasteurella multocida*, с последующим наложением карантина и комплексом противозооотических мер, и инаппарантную форму, в случае отсутствия патогенных свойств, при котором основные действия будут нацелены на проведение специфической профилактики и усиление ветеринарно-санитарного режима.

Приведённые выше критерии послужили поводом пересмотра действующих методических указаний по диагностике пастереллеза с учётом всех современных методов и средств диагностирования, а также полученных результатов настоящей работы, в ходе чего нами были усовершенствованы системные подходы и разработаны новые методические указания – «Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей» и «Диагностика мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота». Мы не сочли достаточным разработать современную систему подходов к диагностике только мангеймиоза, так как в противном случае останется действующим предыдущий документ с противоречивыми данными.

Существенным недостатком диагностики мангеймиоза, на наш взгляд, является отсутствие коммерческих средств серотипизации манхемий. Поскольку наиболее этиологически значимым является серотип A1, то лишь при подтверждении этого можно устанавливать положительный диагноз.

Результатом микробиологических исследований проб секционного и клинического материала, в ходе которых и были внедрены новые методические указа-

ния, стало получение эпизоотических изолятов бактерий семейства Pasteurellaceae, в последующем изученных, паспортизированных и размещённых в коллекции ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко. Кроме того, проведение микробиологических исследований позволили нам изучить и сравнить эпизоотическую обстановку по пастереллёзу и манхеймиозу. При анализе статистических данных, предоставляемых ВНИИЗЖ совместно с Центром ветеринарии за 2016-2017 годы, было подтверждено неблагополучие в 55-ти овцеводческих и скотоводческих предприятиях РФ. При этом, лишь в одном случае, в хозяйстве Краснодарского края, был выделен изолят *Mannheimia haemolytica*, что составляет 1,8 %. В нашем же случае количество выделенных изолятов *Pasteurella multocida* составило 16, в то время как *M. haemolytica* – 5, что составляет 23,8 %. Но приведённое соотношение не стоит рассматривать как финальное значение, так как этиологическую значимость мы смогли доказать лишь у 2-ух изолятов манхемий, вследствие чего данный вид в структуре пастереллёзных заболеваний проявил уровень 9,5 %. В качестве объяснения сложившейся ситуации, касающейся существенной разницы структурного значения манхеймиоза, стоит рассмотреть сложность проведения лабораторно-диагностических исследований на местах с целью выявления *Mannheimia haemolytica* при использовании рутинных методов в сравнении с экспрессивными методами. Рутинные методы микробиологии, вне зависимости от наличия определённых методических принципов, имеют прямую зависимость от человеческого фактора, в то время как экспрессивные методы позволяют выявить возбудителя, в том числе неживого, в минимальном количестве и с минимизацией внешних факторов. Например, М.А. Шибаяев в одной из своих работ, по разработке метода выявления генома *Mannheimia haemolytica* методом ПЦР, привел полученные результаты, свидетельствующие о том, что из 35 исследованных образцов патологического материала положительные результаты были получены в 19 случаях, т.е. в 54 % случаев [41]. Эти данные позволяют говорить о высокой степени чувствительности молекулярно-биологических методов выявления манхемий в сравнении с рутинными микробиологическими методами. Но недостатком экс-

пресс-метода является невозможность подтитровки эффективного антибактериального средства.

В ходе выполнения работы было установлена высокая заболеваемость животных, достигающая 60 %, летальность, находящаяся в пределах 3-6%. Эти данные достигнуты при использовании предварительных антибиотикообработок, что полностью соответствует зарубежному опыту. Но превентивное использование антибактериальных средств удорожает себестоимость конечной продукции, снижает ее качество, а также способствует развитию и распространению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Именно поэтому, не смотря на низкую летальность, специфическая профилактика мангеймиоза является полноценным средством оздоровления поголовья и достижения эпизоотического благополучия хозяйств.

Доказав целесообразность использования биопрепарата для защиты животных от возбудителя мангеймиоза, нами была поставлена задача по разработке и оптимизации технологии изготовления данного средства с воспроизводимыми методами его контроля.

Первые этапы работы заключался в технологическом подборе культур микроорганизмов, отвечающих свойствам контрольно-производственных штаммов. При проведении микробиологического анализа проб секционного и клинического материала поступившего из ряда регионов России, нами было выделено 5 культур *M. haemolytica* по культуральным, морфологическим, тинкториальным, сахаролитическим и протеолитическим свойствам соответствующих данным, приведённым в идентификаторе нетривиальных грамотрицательных микроорганизмов, на основании чего они были идентифицированы до вида и биовара. При этом было доказано, что штаммы *M. haemolytica* 219 и *M. haemolytica* 207, выделенные из секционного материала, поступившего из хозяйств республики Мордовия, являются разными, а не одним штаммом, циркулирующим в регионе. Данный вывод был сделан на основе различия биохимического профиля данных культур, в частности, *M. haemolytica* 219 в отличие от штамма *M. haemolytica* 207 обладал положитель-

ной бета-галактозидазной активностью (ОНПГ) и способностью ферментировать глицерол.

Наиболее объёмным этапом подбора контрольно-производственного штамма являлось доказательство его этиологической значимости в плане серотиповой принадлежности и наличия патогенных свойств. Первой сложностью, с которой пришлось столкнуться в работе, является отсутствие средств, позволяющих проводить серотипизацию культур манхемий. Но, поскольку мы изначально не ставили перед собой цель серотипизации всех выделенных культур манхемий, то остановились на выборе методики, в которой сравнивали свойства капсульного антигена испытуемого штамма со штаммом заранее известного серотипа (по методике Е.Л. Биберстейна [50]). Данная методика подтвердила свою работоспособность и продемонстрировала высокую чувствительность при проведении серотиповой идентификации. Результатом исследований на данном этапе стал отбор двух штаммов, относящихся к серотипу A1.

Второй частью этого этапа стало определение патогенных свойств у штаммов манхемий, которая в свою очередь делилась на несколько серий опытов. Первая серия опытов по определению патогенности заключалась в провоцировании гибели лабораторных животных посредством инфицирования их стандартизированной суспензией живых клеток испытуемых штаммов. Так, по общепринятой методике патогенными признавались микроорганизмы, которые вызывают гибель двух белых мышей при подкожном инфицировании их суспензией содержащей 1 млрд. микробных клеток в 1 см³, объём вводимой суспензии должен составлять 0,5-1 мл. Исключением являются случаи изначально низкой патогенности штаммов или их видоспецифичность в отношении макроорганизма, в том числе *M. haemolytica*.

По существующим литературным данным экспериментальное воспроизведение данной инфекции с использованием лабораторных животных затруднено, ввиду необходимости создания ряда предрасполагающих факторов. Иными словами стандартный подход не позволяет провести заражение лабораторных животных ввиду невосприимчивости к данной инфекции. При этом использование це-

левых видов животных – крупного и мелкого рогатого скота при экспериментальном инфицировании является экономически не целесообразным.

На основании этого перед нами стояла необходимость разработки метода воспроизведения экспериментальной инфекции лабораторных животных. В качестве дополнительной причины важности данной задачи стоит считать необходимость последующего контроля иммуногенной или антигенной активности разрабатываемого биопрепарата при государственной регистрации и последующей сертификации. В ходе данного испытания была доказана невозможность использования стандартной схемы при изучении патогенности у манхемий.

В качестве метода изучения патогенности нами была предпринята попытка использования линий иммунодефицитных белых мышей, а способ инфицирования с подкожного заменен на интраназальный. Именно данный подход позволил воспроизвести заболеваемость и гибель используемых животных с проявлением свойственных респираторных поражений. В данном случае патогенность была зафиксирована у штамма *M. haemolytica* КАВ-1 («КЛ-ВИЭВ»), так как именно данные культуры привели к гибели всех испытуемых животных. Факт гибели одного животного, инфицированного штаммом *M. haemolytica* № 207, мы не стали рассматривать как критериальный, так как патогенность есть свойство вида бактерий, ее условием для нас была обязательная гибель всех животных, используемых в опыте, с развитием у них характерных клинико-морфологических проявлений заболевания. При этом отказ от использования 48-часовой бульонной культуры при инфицировании был обусловлен возможностью гибели животных от токсина, накопленного в бульоне, без развития видимых патологических процессов [109].

Третья серия экспериментов нами была выполнена с целью моделирования опытов по определению патогенности штаммов манхемий на обычных линиях лабораторных объектов, что позволило бы снизить стоимость этих исследований. Используемый в этом случае принцип был близок к предыдущему, но его модификацией стало искусственное создание иммуносупрессорных животных. В данном случае мыши перед инфицированием были предварительно обработаны декс-

аметазоном, что позволило нам вызвать у них проявление заболевания и провести определение значения показателя LD₅₀.

Таким образом, использование общепринятой методики определения патогенности для штаммов *Mannheimia haemolytica* путём подкожного инъецирования суспензии бактериальных клеток возбудителя белым мышам не позволяет спровоцировать развитие у них патологического процесса у лабораторных животных с последующей их гибелью и определить показатель патогенности. Для достижения этой цели необходимо использовать лабораторных животных с пониженным иммунным статусом или самостоятельно подавлять иммунитет у подопытных животных применением иммуносупрессоров. Кроме того, для достижения максимально быстрого развития патологического процесса целесообразным является использование способа инфицирования, при котором колонизация дыхательных путей производится наиболее интенсивно. В нашем случае интраназальное введение живых бактериальных клеток *M. haemolytica* в концентрации $5 \cdot 10^9$ мкр. кл. спровоцировало развитие специфических респираторных поражений у мышей с последующей их гибелью в течение 2-5 дней. Вирулентность штамма *M. haemolytica* КАВ-1 составила $3,5 \cdot 10^8$ мкр. кл., в то время как значение аналогичного показателя у штамма *M. haemolytica* № 217 было на уровне $4,8 \cdot 10^8$ мкр.кл. Полученные результаты позволили нам определить штамм *M. haemolytica* КАВ-1 как соответствующий свойствам производственного и депонировать в государственной коллекции контрольно-производственных штаммов, а штамм *M. haemolytica* № 217 определить в качестве альтернативного при биопроизводстве или контрольного в качестве заражающей культуры.

Одним из критериев контроля биопрепаратов является антигенная активность. В ранее проведённых исследованиях нами была установлена возможность использования реакции непрямой гемагглютинации для серотипирования штаммов манхемий по капсульному антигену, но в связи с ее сложностью исполнения, связанную с длительной гипериммунизацией животных, для определения антигенности наш выбор был остановлен на реакции агглютинации. Безусловно, реакция агглютинации не способствует количественному определению значения пока-

зателя ImD_{50} , но выбранный способ позволил оценить и сравнить антигенность двух штаммов манхемий которые ранее подтвердили свою патогенность.

При выборе способа эвтаназии опытных лабораторных животных, используемых в опытах, был выбран метод остановки сердечной деятельности с применением пропофола. Использование иных методов эвтаназии животных, в данном исследовании, не представлялось возможным для избежания обширного предсмертного поражения дыхательной системы. После умерщвления животные подверглись патологоанатомическому вскрытию для фиксации возможных изменений в тканях и паренхиматозных органах, а также для отбора образцов тканей с целью проведения бактериологического исследования.

Использование триады Коха в качестве основного критерия в установлении этиологической значимости серотипов манхемий позволило нам разработать работоспособную схему установления патогенности штаммов данного вида, а сам принцип использовать для контроля эффективности иммунобиологических средств.

Определив подходящий изолят, пригодный для использования в качестве производственного штамма, мы перешли к разработке методов получения объема антигена и компоновки вакцинопрепарата в лабораторных и производственных условиях, позволяющих накопить и инактивировать бактериальную массу с минимальными экономическими затратами и соответствующим критериям вакцинопрепарата (Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ). Именно поэтому второй этап работы заключался в разработке и оптимизации режимов технологической схемы получения пилотного биопрепарата. Отработка схемы получения препарата в лабораторных условиях была необходима для минимизации затрат в случае получения неудачного результата проведения опыта, а также при необходимости получения небольшого количества бактериального антигена. Так, например, при изучении иммуногенных и антигенных свойств штаммов на целевых видах животных экономически не выгодно выращивать целый реактор бактериальной массы, так как штамм может оказаться не

подходящим, а полученная бактериальная масса – непригодной для компоновки вакцины.

При подборе оптимального состава питательной среды основным критерием её оценки питательных сред являлся период времени культивирования, при котором происходит увеличение концентрации бактериальной массы, т.е. длительность экспоненциальной фазы и максимальная концентрация бактериальной массы, достигнутая на момент прекращения роста микроорганизмов в стационарной фазе. Критерием оценки экономической целесообразности использования питательной среды явилась себестоимость единицы произведённой продукции.

Дальнейшей реализацией задач исследования являлась разработка и применение методов контроля полученного биопрепарата – пилотной вакцины «Манхемвак». В ходе исследований определены воспроизводимые методы контроля на стерильность, антигенную активность в реакции агглютинации, иммуногенную активность при использовании морских свинок, безвредность. Проведенные контроли позволили допустить экспериментальные серии изготовленного препарата к производственной апробации.

Заключительный этап настоящей работы подразумевал проведение клинических испытаний разработанной вакцины с целью доказательства безвредности и ареактогенности, антигенной активности на целевых видах животных. Для реализации этой части исследований были проведены испытания экспериментальных серий вакцины в производственных условиях на молодняке крупного и мелкого рогатого скота, на глубокостельных коровах, суягных овцематках и сукотных козах. Полученные результаты удовлетворяют требованиям безопасности применения биопрепаратов, а результаты антигенной активности свидетельствуют о потенциальных протективных качествах полученной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота. Критерии безвредности, ареактогенности, антигенных свойств вакцинопрепаратов против пастереллезных инфекций были полностью достигнуты при испытании созданной вакцины.

6. ВЫВОДЫ

1. При обследовании 21-ти одного неблагополучного хозяйства установлена этиологическая роль *Mannheimia haemolytica*, которая в структуре пастереллёзной патологии составляет 9,5%. Мангеймиоз проявляется как оппортунистическая инфекция крупного и мелкого рогатого скота с неспецифичной клинико-морфологической картиной и сложной лабораторной диагностикой, особенностью которой являются отсутствие полного спектра средств для серотипизации и патогенных свойств возбудителя для лабораторных животных.

2. Научно обоснована и систематизирована диагностика мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота, разработана схема бактериологического исследования для установления диагноза – мангеймиоз.

3. Установлено, что к мангеймиозу наиболее восприимчивы телята в возрасте до 6 месяцев, ягнята – до 3 месяцев. Основными клиническими проявлениями болезни являются: лихорадка, сухой кашель, постепенно переходящий во влажный, обильные слизистые и серозно-слизистые выделения из носовых ходов, иногда – признаки катарального энтерита, кератоконъюнктивита у ягнят. При проведении патологоанатомического вскрытия у молодняка установлены преобладающие признаки: лобулярная фибринозная бронхопневмония или крупозная пневмония; интерстициальный отёк лёгких; серозно-фибринозный плеврит, серозно-фибринозный перикардит, бронхиальный лимфаденит, застойная гиперемия сосудов трахеи с множественными кровоизлияниями. У взрослых животных диарея отсутствует, отмечается воспаление надвымянных и бронхиальных лимфоузлов. Для лактирующих животных свойственным признаком является снижение молочности.

4. На основании биологических особенностей штаммов *Mannheimia haemolytica*, а также эпизоотологических и клинико-морфологических особенностей вызываемой ими болезни, обоснована необходимость создания и применения вакцины инактивированной против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота.

5. Получено 5 эпизоотических изолятов бактерий *Mannheimia haemolytica*, которые изучены по культуральным, морфологическим, тинкториальным, биохимическим

мическим, серологическим и биологическим свойствам и внесены в коллекцию ФГБНУ ВИЭВ как перспективные в качестве музейных и производственных.

6. При изучении биологических и иммуногенных свойств отобран изолят, соответствующий требованиям, предъявляемым к производственным и контрольно-производственным штаммам для изготовления вакцинопрепаратов. Штамм *Mannheimia haemolytica* «КЛ-ВИЭВ», относящийся к серотипу A1, депонирован в государственной коллекции микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

7. На основе производственного штамма *Mannheimia haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» сконструирована инактивированная эмульгированная моновакцина против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота – «Манхемвак». Определены биотехнологические параметры изготовления вакцины и оптимальный адъювант - Montanide ISA 70.

8. Готовый препарат с оптимальной иммунизирующей дозой 3,0 млрд. мкр. кл. в 1 см³ является безвредным и ареактогенным для лабораторных и естественно восприимчивых животных. Вакцина инактивированная эмульгированная против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота обладает выраженной протективной эффективностью. Разработана технология ее производства, методы контроля и способ применения.

9. Клинически подтверждены безвредность, ареактогенность и высокая антигенная активность при подкожном способе инъектирования вакцины «Манхемвак» в производственных условиях скотоводческих и овцеводческих предприятий (средний титр антител после двукратного вакцинирования крупного рогатого скота составил 1:1360, а для мелкого рогатого скота 1:1080), а также в лабораторно-производственных условиях вивария Вышневолоцкого филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

7. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты, полученные в ходе выполнения исследовательской работы легли в основу методических указаний «Диагностика манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота», а также «Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей».

Выделенные и изученные в ходе работы эпизоотические штаммы пастерелл и манхемий паспортизированы и депонированы в коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко, в частности: 11 штаммов бактерий *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*, 3 штамма *Pasteurella multocida* subsp. *septica*, 2 штамма *Pasteurella multocida* subsp. *gallicida*; 5 штаммов *Mannheimia haemolytica*; 1 штамм *Pasteurella aerogenes*; 1 штамм *Mannheimia glucosida*; 1 штамм *Bibersteinia trehalosi*. Штамм *Mannheimia haemolytica* КАВ-1 прошёл патентное депонирование в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии, получив наименование «КЛ-ВИЭВ».

На производственные и контрольные штаммы *Mannheimia haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» и «ВИЭВ №217» разработан и утверждён стандарт организации ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко СТО 00496165-0003-2017 «Производственные и контрольные штаммы *Mannheimia haemolytica* (метод изготовления и контроля посевных материалов)».

Разработан промышленный технологический регламент на производство и контроль вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак».

Разработан проект инструкции по применению вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак».

8. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Ветеринарным специалистам животноводческих предприятий и частных индивидуальных хозяйств рекомендуется проводить мониторинг манхеймиоза бактериологическими методами и совершенствовать лечебно-профилактические мероприятия, направленные против данного заболевания, с применением новых средств и методов, предложенных в данной работе.

При проведении эпизоотического мониторинга пастереллёза и манхеймиоза рекомендуется использовать методические указания «Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей» и «Диагностика манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота».

Штамм *Mannheimia haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» рекомендуется использовать в качестве контрольно-производственного для разработки средств специфической профилактики манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота.

Для профилактики манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота рекомендуется использовать вакцину инаktivированную эмульгированную «Манхем-вак» двукратно в дозе 2 см³ для телят, ягнят и овец при подкожном способе введения. Для взрослого крупного рогатого скота рекомендуемая доза составляет 3 см³. Интервал между вакцинациями не должен превышать 21 день.

Результаты научной работы рекомендуется внедрить в производство вакциннопрепаратов против манхеймиоза.

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аблов, А.М. Пастереллез животных и птиц в Иркутской области / А.М. Аблов, А.С. Батомункуев, А.А. Плиски, Е.В. Анганова // Достижения науки и техники АПК. –2013. – № 9. – С. 68-69.
2. Андриян, Е.А. Пути оздоровления хозяйства от инфекционного атрофического ринита и энзоотической бронхопневмонии свиней и изучение некоторых особенностей эпизоотологии атрофического ринита //автореф, дис. ... канд. вет. наук / Е.А. Андриян. – Харьков, 1962.
3. Вейант, Р. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (аэробных и факультативно анаэробных) / Р. Вейант, У. Мосс, Р. Уивер // Справочник. – Мир. – 1999. – С. 790.
4. Воронин, Е.С. Инфекционные болезни животных / Е.С. Воронин, Б.Ф. Бессарабов // Учебник. – 2007. – С. 671.
5. Гуленкин, В.М. Атлас популяции основных видов сельскохозяйственных животных в Российской Федерации / В.М. Гуленкин, Ф.И. Коренной, Д.С. Баташова, А.К. Караулов // 2016. – С. 26.
6. Джупина, С.И. Особенности профилактики пастереллёза и геморрагической септицемии / С.И. Джупина // Ветеринарная патология. – 2016. – № 1 (55). – С. 5-11.
7. Джупина, С.И. Различия контроля над эпизоотическими процессами пастереллёза и геморрагической септицемии / С.И. Джупина // Ветеринария сегодня. – 2015. – № 1 (12). – С. 53-58.
8. Документы МЭБ. Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (млекопитающих, птиц и пчел).
9. Душук, Р.В. Болезни, вызываемые пастереллами. Пастереллёзы / Р.В. Душук // Инфекционные болезни животных, -М.: Агропромиздат – 1987. – С. 188-195.
10. Жаров, А.В. Патологическая анатомия животных. /А.В. Жаров // Учебник. 2-е изд., перераб. и доп. СПб.: Издательство «Лань» – 2013. – С. 608.
11. Заерко, В.И. Универсальная технология изготовления, контроля и применения некоторых вакцин против пастереллеза животных. / В.И. Заерко //В сборнике: Достижения ветеринарной медицины - XXI веку Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ИВМ Алтайского Государственного аграрного университета. Алтайский Государственный аграрный университет. – 2002. – С. 244-245.
12. Инструкция на применение вакцины Бовилис Бовипаст RSP против парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллеза крупного рогатого скота инактивированная. Intervet International B.V., Нидерланды.
13. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации пастереллеза сельскохозяйственных животных. // Консультант Плюс

14. Инструкция по применению вакцины ВанШотУльтра 8 для профилактики клостридиозов и пастереллеза крупного рогатого скота (организация-разработчик компания «Pfizer Inc», США).
15. Инструкция по применению вакцины инаktivированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-сенцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза крупного рогатого скота (КОМБОВАК-Р). ООО «Ветбиохим».
16. Инструкция по применению вакцины против пастереллёза крупного рогатого скота инаktivированная эмульгированная «Пастервакарм».
17. Инструкция по применению вакцины против пастереллёзов жвачных животных инаktivированной эмульгированной «Пульмовак».
18. Капустин, А.В. Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей / А.В. Капустин, А.И. Лаишевцев, И.Ю. Ездакова, В.Н. Скворцов, Т.В. Степанова, М.И. Гулюкин // Методические указания. 2016. – С. 29.
19. Лаишевцев, А.И. Сравнительный анализ антибиотикочувствительности коллекционных штаммов *Pasteurella multocida*, выделенных в период до 1990 г., с полевыми изолятами, выделенными в течение 2014-2016 гг. от крупного и мелкого рогатого скота на территории Российской Федерации / А.И. Лаишевцев, А.В. Капустин, А.М. Гулюкин // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – № 63. – С.132-138.
20. Лаишевцев, А.И. Диагностика мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота / А.И. Лаишевцев, А.В. Капустин, Э.А. Якимова, А.Д. Забережный, М.И. Искандаров, А.А. Шабейкин, И.В. Полякова // Методические указания. – 2017. – С. 25.
21. Лаишевцев, А.И. Обзор современных средств специфической профилактики пастереллёза и мангеймиоза сельскохозяйственных животных / А.И. Лаишевцев, А.В. Капустин, Н.В. Пименов // Ветеринария и кормление. – 2017. – № 3. С. 64-66.
22. Лысак, В.В. Микробиология практикум. / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина // Минск. – 2015. – С. 116.
23. Лях, Ю.Г. Пастереллез крупного рогатого скота (эпизоотология и специфическая профилактика) // автореф. дис. ... канд. вет. наук/ Ю.Г. Лях – Минск, 1994.
24. Лях, Ю.Г. Распространение пастереллеза в Беларуси и пути его ликвидации / Ю.Г. Лях // Ученые записки учреждения образования "Витебская ордена "Знак почета" государственная академия ветеринарной медицины". – 2013. – Т. 49. – № 2-1. – С. 96-101.
25. Максимов, Н.А. Патологическая морфология и патогенез инфекционного атрофического ринита свиней // автореф. дис. ... канд. вет. наук / Н.А. Максимов. Москва. – 1965.
26. Мальцева, Б.М. Экспериментальная иммунизация телят антигенами *pasteurella haemolytica*. / Б.М. Мальцева // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2001. – № 4.

27. Методические указания по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц № 22-7/82 от 20.08.1992 г.
28. Методические указания по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях (11.09.2000г. № 13-7-2/2137).
29. Нурмухамедов, Х.Н. Патоморфология инфекционного атрофического ринита свиней в Узбекистане // автореф. дис. ... канд. вет. наук / Х.Н. Нурмухамедов. – Казань. – 1964.
30. Осипова, Н.И. Изучение биологических свойств штаммов *Mannheimia haemolytica* [род *pasteurella*] / Н.И. Осипова // Ветеринария. Реферативный журнал. 2011. – № 2. – С. 322.
31. Отчёт. Роль и место Федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ») в разработке и создании перспективных средств диагностики и специфической профилактики в Российской Федерации. – Киев. – 2013. – С. 23.
32. Паладьева, Д.Е. Атрофический ринит свиней: характеристика заболевания и изучение возбудителя. / Д.Е. Паладьева, А.Г. Семанин, Е.И. Суркова, А.С. Скорик, А.Н. Пирюшова, Ю.Б. Васильева //В сборнике: Студенческий научный форум – 2015 VII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание. –2015.
33. Панин, А.Н. Пастереллез животных / А.Н. Панин, Р.В. Душук //Ветеринария. 2012. – № 6. – С. 3-8.
34. Пешкова, Е.В. Разработка ИФА для серодиагностики манхеймиоза КРС / Е.В. Пешкова, А.В. Кононов //XL Международной научно-практической конференции «Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки». – Россия. – 2016.
35. Семенцов, В.И. Пастереллез свиней / В.И. Семенцов, И.А. Болоцкий, С.В. Пруцаков, А.К. Васильев, С.А. Аксененко // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 5. – С. 9-10.
36. Ханеев, В. Пастереллез крупного рогатого скота / В. Ханеев // Животноводство России. – 2015. – № 11. – С. 45-47.
37. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Д.Ж. Стейли, С. Уильямс // Под ред.; в 2-х т. – М.: Мир, 1997. – Т.1. – С. 432.
38. Чекулаева, Л.Н. Изучение вирусных агентов, выделенных от свиней из хозяйств неблагополучных по инфекционному атрофическому риниту. // автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л.Н. Чекулаева – Вологда. – 1966.
39. Шегидевич, Э.А. Роль пастерелл в респираторной патологии овец и крупного рогатого скота // автореф. дис. ... канд. вет. наук / Э.А. Шегидевич – Москва. – 1993.
40. Шегидевич, Э.А. Состояние и перспективы изучения пастереллёзов сельскохозяйственных животных / Э.А. Шегидевич //Актуальные проблемы ветеринарии в промышленном животноводстве. Сборник научных трудов. ВИЭВ. – М.: – 1984. – Т.60. –С. 58-63.

41. Шибаев, М.А. Разработка метода выявления *Mannheimia haemolytica* с помощью полимеразной цепной реакции и нуклеотидного секвенирования / М.А. Шибаев // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4. – С. 95-99.
42. Щербаков, А.В. Методика обнаружения *Mannheimia haemolytica* методом полимеразной цепной реакции: методический материал / А.В. Щербаков, А.М. Тимина, А.С. Яковлева, В.Ф. Ковалишин // ФГУ ВНИИЗЖ. – Владимир. – 2007.
43. Abutarbush, M. Comparison of the Efficacy of Bar-Vac® 10 Ways Con Retigen® and Ultra-choice™ Eight Vaccines in Sheep in Field Conditions Sameeh / M. Abutarbush //Khaled Daoud and Safdar Muhammad. – 2015.
44. Al-Sultan, I.I. Promotion of *Pasteurella haemolytica* infection in mice by iron. / I.I. Al-Sultan, I.D. Aitken // Research in Veterinary Science. – 1984. – P. 385–386.
45. Ames, T.R. Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. / T.R. Ames, R.J. F. Markham, A.J. Opuda //Canadian Journal of Comparative Medicine. – 1985. – P. 395–400.
46. Anders, M. Identification of a novel *Mannheimia granulomatis* lineage from lesions in roe deer (*capreolus capreolus*). / M. Anders // Journal of Wildlife Diseases. – 2007. - 43(3). – P. 345–352.
47. Angen, O. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. Nov., *Mannheimia ruminalis* sp. Nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov, Int / O. Angen, O. R. Mutters, D.A. Caugant, J.E. Olsen, M. Bisgaard // J. Syst. Bacteriol. – 1999. – P. 67—86.
48. Angen, Q. Investigations on the species specificity of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotyping. / Q. Angen, M. Quirie, W. Donachie, M. Bisgaard // Vet. Microbiol. –1999. – 65. – P. 283-290.
49. Babiuk, LA. Use of recombinant bovine α 1-interferon in reducing respiratory disease induced by bovine herpesvirus type 1. / LA. Babiuk, MJ. Lawman, GA. Gifford //Antimicrob Agents Chemother. – 1987. – 31. – P. 752–757.
50. Biberstein, E. L. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. / E. L. Biberstein, M. Gills, H. Knight // Cornell Vet. – 1960. – P. 283-300.
51. Birbir, M. A comparison of the cytotoxicity of *Pasteurella haemolytica* A and *Pasteurella haemolytica*-like organisms for chickens. / M. Birbir, T. Bowersock, D. Ryker, A. Ilgaz. //Turk Veterinerlik ve Hayvancilik Dergisi. – 1995. - 19(2). – P. 79-85.
52. Blackall, P. J. Phenotypic characterisation of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. / P.J. Blackall, M. Bisgaard, C.P. Stephens // Aust. Vet. J. – 2002. – P. 87–91.

53. Botcher, L. Zur Pathogenese und Immunprophylaxe von *Pasteurella haemolytica* Infektionen / L. Botcher //Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. – 1988. – P. 221-228.
54. Brogden, K.A. Effect of *Pasteurella haemolytica* “A1” capsular polysaccharide on sheep lung in vivo and on pulmonary surfactant in vitro. / K.A. Brogden, C. Adlan, H.D. Lehmkuhl, R.C. Cutlip, J.M. Knights, R.L. Engen //American Journal of Veterinary Research. – 1989. – P. 555–559.
55. Brogden, K.A. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. / K.A. Brogden, H.D. Lehmkuhl R.C. Cutlip // Veterinary Research. – 1998. – P. 233–254.
56. Carter, G.R. *Pasteurella* infections as sequelae to respiratory viral infections. / G.R. Carter // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 1973. – P. 863–864.
57. Carter, G.R. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. / G.R. Carter // Adv. Vet. Sci. – 1967. – P. 321-379.
58. Carter, G.R. Studies on pneumonia of cattle. I. Experimental infection of calves with *Pasteurella haemolytica*. / G.R. Carter// Canadian Journal of Comparative Medicine. – 1956. – P. 374–380.
59. Cassirer, E.F. Evaluation of ewe vaccination as a tool for increasing bighorn 31 lamb survival following pasteurellosis epizootics./ E.F. Cassirer, K.M. Rudolph, P. Fowler, V.L. Coggins, D.L. Hunter, M. Mille // Journal of Wildlife Diseases. – 2001. – 37(1). – P. 49–57.
60. Catry, B. Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types. / B. Catry, F. Haesebrouck, S.D. Vlieghe, B. Feyen, M. Vanrobaeys, G. Opsomer, S. Schwarz, A.D. Kruif //Microb Drug Resist. – 2005. – 11. – P.387-394.
61. Chae, CH. Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica*, serotype 1. / CH. Chae, MJ. Gentry, AW. Confer // Vet Microbiol. – 1990. – 25(2-3). – P. 241-251.
62. Christensen, H. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, ‘*Actinobacillus salpingitidis*’ or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. Nov., comb. Nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. Nov. / H. Christensen, M. Bisgaard, AM. Bojesen, R. Muttters, JE. Olsen //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003. – 53(1). – P. 275-287.
63. Christensen, H. *Mannheimia caviae* sp. nov., isolated from epidemic conjunctivitis and otitis media in guinea pigs / H. Christensen // Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen.
64. Clarke, JM. Development of an ex vivo model to study adherence of *Mannheimia haemolytica* serovar 1 to mucosal tissues of the respiratory tract of cattle. / JM. Clarke, RJ. Morton, CR. Clarke // Am J Vet Res. – 2001; 62(5). – P. 805.

65. Cutlip, R.C. Chronic effects of coinfection in lambs with parainfluenza-3 virus and *Pasteurella haemolytica*. / R.C. Cutlip, H.D. Lehmkuhl, K.A. Brogden // *Small Ruminant Research*. – 1993. – P. 171–178.
66. Czuprynski, C.J. Interaction of bovine alveolar macrophages with *Pasteurella haemolytica* A1 in vitro: modulation by purified capsular polysaccharide. / C.J. Czuprynski, E.J. Noel, C. Adlam // *Vet Microbiol*. – 1991. – 26(4). – P.349-58.
67. Czuprynski, C.J. Modulation of bovine neutrophil antibacterial activities by *Pasteurella haemolytica* A1 purified capsular polysaccharide. / C.J. Czuprynski, E.J. Noel, C. Adlam // *Microb Pathog*. – 1989. – 6(2). – 133-41.
68. Dewani, P. Bacteriological studies on mastitis in ewes and goats. / P. Dewani, R. Rind, B. Bhutto // *Journal of Animal and Veterinary Advances*. – 2002. – 1(2). – 98-100.
69. Diéguez, C. J. Infecciones Respiratorias Bovinas: Etiología, Epidemiología y Cuadro Clínic / C.J. Diéguez, M. Luisa Sanjuán Herman Pérez, E. YusRespaldiza. // *Enf. infecciosas: bovinos en general*. 2003.
70. Dungworth, D.L. The respiratory system. In: *Pathology of Domestic Animals*. / D.L. Dungworth // vol. 2, 3rd edn. – 1993. – P. 539–699.
71. Dyer, R.M. The bovine respiratory disease complex: A complex interaction of host, environmental, and infectious factors. / R.M. Dyer // *The Comp. on Cont. Educ. for Pract. Veterinarian*. – 1982. – P. 5296-5307.
72. Fett, T. Mannheimiosis: from a (molecular) fatal attraction to one of the most important ruminant breeding disease / T. Fett, L. Zecchinon, P. Vanden Bergh, D. Desmecht // *Annales de Medecine Veterinaire*. – 2009. – T. 153. № 1. – P. 31-53.
73. Foreyt, W.J. Attempted protection of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) from pneumonia using a nonlethal cytotoxic strain of *Pasteurella haemolytica* biotype “A”, serotype 11. / W.J. Foreyt, R.M. Silflow // *Journal of Wildlife Diseases*. 1996. – P. 315–321.
74. Frank, G.H. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. / G.H. Frank, P.C. Smith // *Am. J. Vet*. 1983. – P. 981–985.
75. Frank, GH. Effects of vaccination prior to transit and administration of florfenicol at time of arrival in a feedlot on the health of transported calves and detection of *Mannheimia haemolytica* in nasal secretions. / GH. Frank, RE. Briggs, GC. Duff, RW. Loan, CW. Purdy // *American Journal of Veterinary Research*. – 2002. – 63(2). – P. 251-256.
76. Frank, GH. *Pasteurella haemolytica* and pneumonic pasteurellosis in transported cattle. / GH. Frank // *Proceedings One Hundred and Second Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. – 1998. – P. 348-355.
77. Fraser, J. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. / J. Fraser, S. Laird, N.J.L. Gilmour // *Res. Vet. Sci*. – 1982. – 32. – P. 127-128.

78. Fraser, J. Rapid Indirect Hemagglutination Test for Serotyping *Pasteurella haemolytica* / J. Fraser, W. Donachie, M. Quirie // *Journal of clinical microbiology*. – 1983. – Vol. 18, No. 1. – P. 206-207.
79. Fthenakis, GC. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece. / GC. Fthenakis // *Small Ruminant Research*. – 1994. – 13(3). – P. 293-300.
80. Gagro, A. Increased toll-like receptor 4 expression in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. / A. Gagro, M. Tominac, V. Krsulovic-Hresic // *Clin Exp Immunol*. – 2004. – 135. – P. 267–272.
81. Gatewood, D.M. Growth-condition dependent expression of *Pasteurella haemolytica* A1 outer membrane proteins, capsule, and leukotoxin / D.M. Gatewood, B.W. Fenwick, M.M. Chengappa // *Veterinary Microbiology*. – 1994. – 41. – P. 221-233.
82. Gilmour, N.J.L. *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. / N.J.L. Gilmour // *Veterinary Quarterly*. – 1980. – P. 191–198.
83. Gilmour, N.J.L. Pasteurellosis of sheep In: C. Adlam, and J.M. Rutter (Eds.). *Pasteurella and Pasteurellosis*. / N.J.L. Gilmour, J.S. Gilmour // Academic Press, London. – 1989. – P. 223-262.
84. Glynn, H. Rapid Plate Agglutination Procedure for Serotyping *Pasteurella haemolytica* / H. Glynn, G.E. Wessman // *Journal of clinical microbiology*. – 1978. – P. 142-145.
85. Griffin, D. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. / D. Griffin, M. Chengappa, J. Kuszak, D.S. McVey // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 26. – 2010. – P. 381-394.
86. Haji Hajikolaei, M. Bacteriological and serological studies on *Mannheimia haemolytica* infection in cattle slaughtered at Ahvaz (southwestern Iran) / M. Haji Hajikolaei, M. Ghorbanpour, M.R. Seyfiabad Shapouri, A. Rasooli, D. Ebrahimkhani, A.R. Jabbari // *abattoir Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. – 2010. – Vol. 11, №1.
87. Hakim, A.S. Role of Molecular Techniques in Characterization of Bacteria Causing Pneumonia in Small Ruminants / A.S. Hakim // *Life Science Journal*. – 2014. – 11(6).
88. Haritani, M. Immunoperoxidase evaluation of pneumonic lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in calves. / M. Haritani, M. Nakazawa, S. Oohashi // *American Journal of Veterinary Research*. – 1987. – 48. – P. 1358–1362.
89. Hendriksen, R.S. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries. / R.S. Hendriksen, D.J. Mevius, A. Schroeter, C. Teale, D. Meunier, P. Butaye, A. Franco, A. Utinane, A. Amado, M. Moreno, C. Greko, K. Stark, C. Berghold, A.L. Myllyniemi, S. Wasyl, M. Sunde, F.M. Aarestrup // *Acta Vet. Scand*. – 2008.
90. Hilwig, R.W. Experimentally induced pneumonic pasteurellosis: dose response relationships and protection against natural infection in calves. / R.W. Hilwig, J.G. Songer, C. Reggiardo // *American Journal of Veterinary Research*. – 1985. – 46. – P. 2585–2587.

91. Hodgson, P.D. Effect of stress on viral–bacterial synergy in bovine respiratory disease. / P.D. Hodgson, P. Aich, A. Manuja // Plant and Animal Genomics XIII Conference, San Diego, CA. – 2005. – P. 698.
92. Jakab, G.J. Viral-bacterial interactions in pulmonary infection. / G.L. Jakab // Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. 1982. – 26. – P. 155–171.
93. Jaramillo, A.C. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. / A.C. Jaramillo, T.F. Trigo, F. Suárez-Güernes // Vet. Mex. – 2009. – 40. – P. 293-314.
94. Jaworski, M.D. Biovaries of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. / M.D. Jaworski, D.L. Hunter, A.C.S. Ward // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1998, – №10. – P. 49-55.
95. JeongRae, K. Concurrent infection with heartworm and *Pasteurella haemolytica* induced pericarditis in a jaguar (*Panthera onca onca*). / K. JeongRae, K. BangHyun, Y. HanSang, L. DeogYong, K. KiGeun, J. KyungSun, H. WooSuk, L. ByungChun. // Journal of Veterinary Clinics. – 2001. – 18(1). – P. 85-87.
96. Jericho, K.W.F. Pneumonia in calves produced with aerosols of bovine herpes virus 1 and *Pasteurella haemolytica*. / K.W.F. Jericho, E.V. Langford // Can. J. Comp. Med. – 1978. – 42. – P. 269-277.
97. Jeyaseelan, S. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. / S. Jeyaseelan, S. Sreevatsan, S.K. Maheswaran // Anim. Health Res. – 2002. – P. 69–82.
98. Jian, Z. Experimental pneumonia in mice produced by combined administration of *Bordetella parapertussis* and *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep. / Z. Jian, M.R. Alley, B.W. Manktelow // Journal of Comparative Pathology. – 1991. – 104. – P. 233–243.
99. Jones, G.E. The effect of different strains of *Mycoplasma ovipneumoniae* on specific pathogen-free and conventionally reared lambs. / G.E. Jones, J.S. Gilmour, A.G.I. Rae // Journal of Comparative Pathology. – 1982. – 92. – P. 261–266.
100. Kaan, O. Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. / O. Kann, S. Kahya, K. Tayfun // Turk. J. Vet. Anim. Sci. – 2010. – 34(1). – P. 91-94.
101. Kapustin, A.V. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia haemolytica* / A.V. Kapustin, A.I. Laishevcev // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. – T.52. – № 4. – P. 3-12.
102. Lafleur, R.L. Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella* (*Mannheimia*) *haemolytica* leukotoxin. / R.L. Lafleur, C. Malazdrewich, S. Jeyaseelan // Microb Pathog. – 2001. – 30(6). – P. 347-57.

103. Lafleur, RL. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. / RL. Lafleur, MS. Abrahamsen, SK. Maheswaran // *Infect Immun.* – 1998. – 66(9). – 4087.
104. Laishevtcev, A.I. Actualization of principles and methods of laboratory diagnostics of Pasteurellosis of farm animals and birds / A.I. Laishevtcev // *Biotika.* – 2016. – February 1 (8). – P.44-49.
105. Laishevtcev, A.I. Antibiotic resistance of epizootic isolates of *Mannheimia haemolytica*, allocated on the territory of the Russian Federation / A.I. Laishevtcev, A.V. Kapustin, E.A. Yakimova, M.A. Luchko, N.V. Pimenov N.V. // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* – 2017. – 10 (70). – P. 327-330
106. Laishevtcev, A.I. Features of biochemical identification and differentiation of *Mannheimia haemolytica* / A.I. Laishevtcev // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* – 2016. – T. 54, № 6. – P.70-77.
107. Laishevtcev, A.I. Pasteurellosis of farm animals: modern epizootic situation / A.I. Laishevtcev // *Biotika.* – 2016. April 2 (9). – P.41-43.
108. Laishevtcev, A.I. Specific identification of *Pasteurella* bacteria on the basis of biochemical properties in accordance with modern classification / A.I. Laishevtcev, A.V. Kapustin, N.V. Pimenov // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* – 2017. – T. 61, № 1. – P.320-328.
109. Laishevtcev, A.I. 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 / A.I. Laishevtcev // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* – 2017/ - T. 67, №7. – P.288-297.
110. Lefcourt AM. Adrenal responses of Angus X Hereford cattle to the stress of weaning. / A.M. Lefcourt, TH. Elsasser // *J Anim Sc.* – 1995. – 73. – P. 2669–2676.
111. Li, J. Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. / J. Li, K.D. Clinkenbeard // *Infect Immun* 67. – 1999. – P. 2920-2927.
112. Lopez, A. Respiratory system, thoracic cavity and pleura. / A. Lopez // *Thomson's Special Veterinary Pathology*, 3rd edn, Eds 2001. – P. 125–195.
113. Majury, A.L. The effect of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxic culture supernate on the in vitro proliferative response of bovine lymphocytes / A.L. Majury, P.E. Shewen // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1991 a. – P. 41-56.
114. Malazdrewich, C. Pulmonary expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 in the acute phase of bovine pneumonic pasteurellosis. / C. Malazdrewich, TR. Ames, MS. Abrahamsen // *Vet Pathol.* – 2001. – 38(3). – P. 297-310.
115. Martino, PA. Microbiological studies on bovine respiratory disease, a review. / PA. Martino // *Obiettivi e Documenti Veterinari.* – 2000. – 21(10). – P. 29-32.

116. Mehmet, A. Vaccination studies of lambs against experimental Mannheimia (Pasteurella) haemolytica infection. / A. Mehmet, T. Öncel, B. Sareyyüpoğlu, R. Hazıroğlu, O. Yaşar Tel, Z. Cantekin // Small Ruminant Research. – 2006. – 65. – P. 44–50.
117. Midwinter, A.C. Pasteurella haemolytica serotypes from pneumonic goat lungs. / A.C. Midwinter, J.K. Clarke, M.R. Alley // New Zealand Veterinary Journal. – 1985. – 34. – P.35-36.
118. Mirle, C. Untersuchungen zum Auftreten und Bedeutung von Pasteurella-haemolytica - Infektionen bei Hennen unter besonderer Berücksichtigung von Erkrankungen des Legeapparates. / C. Mirle, M. Schongarth, H. Meinhart // Monatsh. Veterinärmed. – 1991. – 46. – P. 545-549.
119. Mohamed, R.A. A review on pneumonic pasteurellosis (Respiratory Mannheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors / R.A. Mohamed, E.B. Abdelsalam //Bulg. J. veter. Med. – 2008. – Vol.11, N 3. – P. 139-160.
120. Mohamed, R.A. The effect of iron compounds and other factors on the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis in Nubian goats. / R.A. Mohamed // Ph.D. Thesis, Faculty of Veterinary Science, University of Khartoum, Sudan. – 2002.
121. Morck, D.W. Electron microscopic description of glycocalyx and fimbriae on the surface of Pasteurella haemolytica. / D.W. Morck, T. Raybould, S. Acres, L. Babiuk, L. Nelligan, J. Costerton. // Al. Can. J. Vet. Res. – 1987. – 51. – P. 83-88.
122. Morck, D.W. Presence of bacterial glycocalyx and fimbriae on Pasteurella haemolytica in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. / D.W. Morck, M.E. Olson, S.D. Acres, P.Y. Daoust, J.W. Costerton // Can J Vet Res. – 1989. – 53. – P.167-171.
123. Ngatia, T.A. Pneumonia in goats following administration of live and heat killed Pasteurella haemolytica. / T.A. Ngatia, C.V. Kimberling, L.W. Johnson, C.E. Whiteman, L.H. Lauermann // Journal of Comparative Pathology. – 1986. – 96. – P. 557–564.
124. Norrung, V. Pasteurella infections in calves. / V. Norrung //Nord. VetMed. – 1960. – 12. – P.425-430.
125. Odendaal, MW. The distribution of Pasteurella haemolytica serotypes among cattle, sheep and goats in South Africa and their association with disease. / MW. Odendaal, MM. Henton // Onderstepoort Journal of Veterinary Research. – 1995. – 62(4). – P. 223-226.
126. Ohmann, HB. Viral–bacterial pneumonia in calves: effect of bovine herpesvirus-1 on immunologic functions. / HB. Ohmann, LA. Babiuk // J Infect Dis. 1985. – 151. P. 937–947.
127. Oladele, SB. Prevalence of bacterial and fungal microflora isolated from some wild and domesticated birds in Zaria, Nigeria. / SB. Oladele, MT. Raji, MA. Raji // Bulletin of Animal Health and Production in Africa. – 1999. – 47(3). – P. 127-132.
128. Pandher, K. Genetic and immunologic analyses of PlpE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of Pasteurella haemolytica serotype one. / K. Pandher, A.W. Confer, G.L. Murphy // Infect Immun 66. – 1998. P. 5613-5619.

129. Paulsen, DB. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced cytotoxicity in bovine pulmonary artery endothelial monolayers: inhibition by indomethacin. / DB. Paulsen, AW. Confer, KD. Clinkenbeard // *Vet Pathol.* – 1995. – 32(2). – P. 173.
130. Pfeffer, A. Pneumonia following experimental bronchial obstruction in sheep. / A. Pfeffer // *Journal of Comparative Pathology.* – 1988. – №98. – P. 167–176.
131. Porter, J.F. Predisposition of specific pathogen-free lambs to *Pasteurella haemolytica* pneumonia by *Bordetella parapertussis* infection. / J.F. Porter, K. Connor, N. Krueger, J.C. Hodson, W. Donachie // *Journal of Comparative Pathology.* – 1995a. – №112. – P. 381–389.
132. Potter, A. Purification of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A-1. / A. Potter, K. Ready, J. Gilchrist. // *Microb. Path.* – 1988. – №4. P. 311–316.
133. Potter, A.A. Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. / A.A. Potter, A.B. Schryvers, J.A. Ogunnariwo, W.A. Hutchins, R.Y.C. Lo, T. Watts // *Microbial Pathogenesis* 27. – 1999. – P. 197–206.
134. Radostits, O.M. *Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.* / O.M. Radostits, C.C. Gay, D.C. Blood, K.W. Hinchcliff K.W. // ninth edn, W. B. Saunders. – 2000.
135. Redondo, E. Spontaneous bovine respiratory syncytial virus infection in goats: pathological findings. / E. Redondo, AJ. Masot, S. Martinez, A. Jimenez, A. Gazquez // *Journal of Veterinary Medicine. Series B.* – 1994. – №41(1). – P. 27–34.
136. Reggie, Y.C. The Outer membrane protein OmpA of *Mannheimia haemolytica* A1 is involved in the binding of fibronectin. // *FEMS Microbiology Letters.* – 2007. – P. 226–231.
137. Schiefer, B. Correlation of microbiological and histological findings in bovine fibrinous pneumonia. / B. Schiefer, G.E. Ward, R.E. Moffatt // *Veterinary Pathology.* – 1978. – №15. – P. 313–321.
138. Slocombe, R.F. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. / R.F. Slocombe, J. Malark, R. Ingersol, F. Derksen, N. Robinson // *American Journal of Veterinary Research.* – 1985. – 46. P. 2253–2258.
139. Smith, G. R. Isolation of two types of *Pasteurella haemolytica* from sheep. / G.R. Smith // *Nature.* – 1959. – №183. – P. 1132–1133.
140. Smith, G.R. *Pasteurella* and *Actinobacillus.* / G.R. Smith, J.E. Philips // *Principles of Bacteriology, Virology and Immunology.* Vol. 2, 8th ed. – 1990. – P. 383–399.
141. Sneath, P.H.A. *Actinobacillus rossii* sp. Nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev. *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. Nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. / P.H.A. Sneath, M. Stevens // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990. – №40. P. 141–153.
142. Srinand, S. Comparative evaluation of antibodies induced by commercial *Pasteurella haemolytica* vaccines using solid phase immunoassays. / S. Srinand, S.L. Hsuan, H.S. Yoo, S.K. Maheswaran, T.R. Ames, R.E. Werdin // *Veterinary Microbiology.* – 1996. – №49. P. 181–195.

143. Srinand, S. Evaluation of three experimental subunit vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle / S. Srinand, T.R. Ames, R.E. Werdin, H.S. Yoo, S.K. Maheswaran // Vaccine. – 1996 a. – №14. – P. 147-154.
144. Straus, DC. Neuraminidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. / D.C. Straus, PJ. Unbehagen PJ. CW. Purdy // Infect Immun. – 1993. – № 61(1). – P. 253.
145. Styrt, B. Granulocyte plasma membrane damage by leukotoxic supernatant from *Pasteurella haemolytica* A1 and protection by immune serum Can. / B. Styrt, R.D. Walker, J.C. White, L.D. Dahl, J.C. Baker // J. Vet. Res. – 1990. – № 54. – P. 146-150.
146. Suzuki, T. An outbreak of fibrinous pleuropneumonia in dairy cows due to *Pasteurella haemolytica*. / T. Suzuki, A. Ikeda, S. Yoshizawa, T. Koizumi, K. Mashima, M. Nakazawa, T. Yoshida, T. Sawada // Journal of the Japan Veterinary Medical Association. – 1995. – 48(10). P. 755-759.
147. Taylor, LF. Outbreak of fibrinous pneumonia in recently weaned beef calves in southern Queensland. / LF. Taylor // Australian Veterinary Journal. – 1998. – 76(1). – P. 21-24.
148. Thirkell, D. The humoral immune response of lambs experimentally infected with *Mycoplasma ovipneumoniae*. / D. Thirkell, R.K. Spooner, G.E. Jones, W.C. Russell // Veterinary Microbiology. – 1990. – № 24. – P. 143–153.
149. Thomson, R.G. The pathogenesis of shipping fever in cattle. / R.G. Thomson // Bovine Proceedings. – 1981. – P. 103-112.
150. Timoney, J.F. The genus *Pasteurella*. In: Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. / J.F. Timoney, J.H. Gillespie, F.W. Scott, J.E. Barlough // Comstock Publishing associates, Ithaca, New York. – 1988. – P. 104-116.
151. URL: <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/javaa/2007/404-409.pdf>
152. URL: http://nexusacademicpublishers.com/uploads/files/RJVP_5_1_5-11.pdf
153. URL: <http://www.fsvps.ru>
154. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/structure/terorgs/kemerovo/newsDetails.html?id=20291>
155. URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2009/vm093h.pdf>
156. URL: https://fsvps.ru/fsvps/download/attachment/1653/Rb_ALERT_229.pdf
157. URL: <https://mic.eucast.org/Eucast2/>
158. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/operative-messages/2016-10-06.pdf>
159. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/operative-messages/2015-10-28.pdf>
160. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/operative-messages/2015-12-21.pdf>
161. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/operative-messages/2015-02-18.pdf>
162. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/operative-messages/2015-11-11.pdf>
163. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/operative-messages/2015-03-11.pdf>
164. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/operative-messages/2016-10-19.pdf>

165. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/operative-messages/2016-08-15.pdf>
166. Vestweber, J.G. Clinical and pathological studies of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia in calves. / J.G. Vestweber, R.D. Klemm, H.W. Leipold, D.E. Johnson, W.E. Bailie // *American Journal of Veterinary Research*. – 1990. – №51. – P. 1792–1798.
167. Viera, F.J.B. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmonies con lewiones inflamatorias en ovinos y caprinos. / F.J.B. Viera, F.J. Trigo, L.J. Meza, F.A. Romero, G.T. Perez, F.S. Guemes // *Vet. Mex*. – 1993. – №24. – P. 107-112.
168. Walker, R.D. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica* / R.D. Walker, F.M. Hopkins, R.W. Schultz, M.D. McCracken, R.N. Moore // *Am. J. Vet. Res*. – 1985. – №46. – P. 2429–2433.
169. Ward, A.C.S. Isolation of Pasteurellaceae from bovine abortions. / A.C.S. Ward // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 1990. – №2. – P. 59-62.
170. Watkins, G.H. The effect of inoculation of *Pasteurella haemolytica* into the lacting mammary gland of mice, rats, rabbits, sows and cows. / G.H. Watkins, M.J. Scott, J.E. Jones // *J. Comp. Pathol*. – №106. – P.221-228.
171. Welsh, R.D. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994-2002. / R.D. Welsh, L.B. Dye, M.E. Payton, A.W. Confer // *J. Vet. Diagn. Invest*. – 2004. – №16. – P. 426-431.
172. Whiteley, L.O. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine *Pasteurella* pneumonia. / L.O. Whiteley, S.K. Maheswaran, D.J. Weiss, T.R. Ames // *Vet Pathol* 27. – 1990. – P. 150-161.
173. Whiteley, L.O. *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. / L.O. Whiteley, S.K. Maheswaran, D.J. Weiss, T.R. Ames, M.S. Kannan // *J. Vet. Intern. Med*. – 1992. – 6. – P. 11–22.
174. Yates, W.D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle, Can. /W.D. Yates // *J. Comp. Med*. – 1982. – 46. – P. 225–263.
175. Zamri, S.M. The role of concurrent haemonchosis in the development of pneumonic pasteurellosis in goats. / S. M. Zamri, P. Subramaniam P. O.A.R. Sheikh, R.A. Sani, A. Rasedee // *Veterinary Research Communications*. – 1994. – 18. – P. 119–122.
176. Zizzo, N. Bacteriological and anatomic-histopatologic investigations on sea turtles beached in Peninsula Salentina coast. / N. Zizzo, G. Normanno, A. Perillo A, G. Marzano // *Summa*. – 2003. – 20(4). – P. 29-34.

11. ПРИЛОЖЕНИЯ

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

№	Документ	Стр.
1.	Методические указания «Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей»	139
2.	Методические указания «Диагностика мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота»	140
3.	Паспорт штамма микроорганизмов <i>Mannheimia haemolytica</i> «КЛ-ВИЭВ» (биовар А, серотип А1)	141
4.	Свидетельство о депонировании штамма <i>Mannheimia haemolytica</i> в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии	144
5.	СТО 00496165-0003-2017 Производственные и контрольные штаммы <i>Mannheimia haemolytica</i> (метод изготовления и контроля посевных материалов)	145
6.	Промышленный технологический регламент на производство и контроль вакцины против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак»	146
7.	СТО 00496165-0004-2017. Вакцина против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированная эмульгированная «Манхемвак»	147
8.	Временная инструкция по применению вакцины против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной	148
9.	Протокол клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины «Манхемвак» против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной в условиях СПА «Колхоз имени Ворошилова»	150
10.	Протокол клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины «Манхемвак» против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной в условиях ЗАО "Племрепродуктор "Васильевское"	151
11.	Протокол клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины «Манхемвак» против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной в условиях ООО «Колхоз Гжельский»	152
12.	Акт клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины «Манхемвак» против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной в условиях вивария ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко	153
13.	ФОТО	154

Методические указания «Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных,
птиц и пушных зверей»

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФГБНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
имени Я.Р. КОВАЛЕНКО

«У Т В Е Р Ж Д А Ю»

Руководитель Секции

зоотехнии и ветеринарии

отделения сельскохозяйственных наук РАН

академик РАН

В.В. Калашников

«01» декабря 2016 год

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ДИАГНОСТИКА ПАСТЕРЕЛЛЁЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ, ПТИЦ И ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ

Методические указания «Диагностика манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота»

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФГБНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
имени Я.Р.КОВАЛЕНКО**

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Секции
зоотехнии и ветеринарии
отделения сельскохозяйственных наук РАН
академик РАН
В.В. Калашников

«28» _____ 2017 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

**ДИАГНОСТИКА МАНХЕЙМИОЗА КРУПНОГО И МЕЛКОГО
РОГАТОГО СКОТА**

Москва, 2017

Приложение 3.

Паспорт штамма микроорганизмов *Mannheimia haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» (биовар А, серотип А1)

ФАНО РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ Я.Р. КОВАЛЕНКО»
(ФГБНУ ВИЭВ)
Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru
ОКПО 00496165, ОГРН 1037700258870, ИНН/КПП 7721017821/772101001

ПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

Номер «ГКПМ-Оболensk»: В-8139
Дата депонирования: 25 июля 2017 года

1. Вид микроорганизма: *Mannheimia haemolytica* (биовар А, серотип А1)
2. Номер в других коллекциях: КАВ-1 (Всероссийская коллекция патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных).
3. Основание для депонирования: штамм обладает высокими антигенными и иммуногенными свойствами, ввиду чего может использоваться в качестве производственно-контрольного при разработке и конструировании диагностикумов и средств специфической профилактики животных.
4. Родословная: нет
5. Патогенность: в соответствии с классификацией микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности санитарных правил 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» бактериальный агент *Mannheimia haemolytica* не относится ни к одной из четырёх групп опасности. Бактериальный агент *Mannheimia haemolytica* является возбудителем манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота ввиду чего является зоопатогенным.
6. Заключение о группе патогенности: к данному виду бактериального агента восприимчивы преимущественно жвачные животные.
7. Дата, источник и место выделения: 2016 г., лёгочные ткани крупного рогатого скота, скотоводческое предприятие Белгородской области.
8. Где идентифицирована культура: лаборатория микробиологии и музей типовых культур ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко
9. Методы идентификации: посредством изучения ферментативных свойств и секвенирования последовательности гена 16S рРНК.
10. Морфологические признаки: коккобациллы, грамотрицательные, размеры клеток находятся в диапазоне 0,3-1,0 x 1,0-2,0 мкм. Расположение клеток в мазке чаще одиночное, реже парное. Расположение клеток цепочками не было зафиксировано. При окрашивании культур манхемий методом Романовского-Гимза клетки тёмно-синего цвета с розовой капсулой.
11. Культуральные особенности: на кровяном агаре колонии гладкие, полупрозрачные, блестящие, диаметром 1-2 мм, с проявлением зоны β-гемолиза в размере 1-1,5 мм вокруг всей колонии. На агаре МакКонки наблюдается рост в виде мелких полупрозрачных колоний. На мясопептонном агаре бактерии демонстрируют скудный рост мелких, размерами 0,5-1 мм, выпуклых, полупрозрачных колоний легко снимающихся бактериальной петлёй или пастеровской пипеткой. На среде для

культивирования гемофилюсов и актинобациллюсов (*Haemophilus test medium* HTM base, Oxoid) бактерии образуют обильный рост гладких, прозрачных, блестящих колоний размером 1-1,5 мм. В бульонных средах, т.е. мясопептонном бульоне, триптон-соевом бульоне, бульоне Хоттингера, Эугоник бульоне, а также в сердечно-мозговом бульоне наблюдается равномерное помутнение среды уже спустя 12 часов культивирования. Рост в полужидком агаре проявляется только по ходу укола петлёй.

12. Биохимические свойства: каталаза +, оксидаза +, восстановление нитрата +, лизиндекарбоксилаза -, орнитиндекарбоксилаза -, аргининдекарбоксилаза -, образование H₂S -, образование индола -, ОНПГ +, уреазы -, реакция VP -, желатиназа -, гидролиз эскулина -, рост на агаре МакКонки +, образование газа из D-глюкозы -, бета-гемоллиз на среде с эритроцитами барана +.

Ферментирование с образованием кислоты: D-адонитола -, L-арабинозы -, D-арабинозы +, арбутина -, целлобиозы -, декстрина +, дульцитолы -, фруктозы +, D-галактозы +, D-глюкозы +, глицеролы +, инулина -, лактозы +, мальтозы +, D-маннитола +, D-маннозы -, мелицитозы -, мелибиозы -, раффинозы +, L-рамнозы -, салицина -, D-сорбитолы +, L-сорбозы -, сахарозы +, трегалозы -, D-ксилозы +.

При идентификации Remel Rapid NF Plus: Aliphatic thiol (TRD) -, triglyceride (EST) -, *p*-Nitrophenyl-phosphoester (PHS) +, *p*-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (NAG) -, *p*-Nitrophenyl- α -D-glucoside (α GLU) +, *p*-Nitrophenyl- β -D-glucoside (β GLU) -, proline- β -naphthylamide (PRO) -, pyrrolidine- β -naphthylamide (PYR) -, γ -Glutamyl β -naphthylamide (GGT) +, tryptophane β -naphthylamide (TRY) -, N-Benzyl-arginine- β -naphthylamide (BANA) -.

13. Серологические свойства: серотип A1. Серотипизация проводилась в реакции непрямой гемагглютинации по капсульному антигену методом, предложенным Biberstein EL.

14. Продукция антигенов, ферментов, токсинов: является продуцентом лейкотоксина

15. Вирулентность для лабораторных животных: результаты биопробы, LD₅₀: лабораторные животные не восприимчивы к данному виду бактерий, тем не менее при интраназальном заражении белых мышей предварительно подвергшихся иммуносупрессии LD₅₀ составляет $3,5 \cdot 10^8$

16. Устойчивость к антибактериальным препаратам: штамм является резистентным к амикацину, гентамицину, неомицину, рифампицину, ванкомицину, меропенему, клиндамицину, линкомицину, кларитромицину, эритромицину, тетрациклину, цефепиму, цефтазидиму; промежуточная чувствительность проявляется в отношении канамицина, фосфомицина, бензилпенициллина, карбенициллина, норфлоксацина, пefлоксацина, цефазолина, цефотаксима; высокая чувствительность проявляется в отношении стрептомицина, триметроприма, имипенема, амоксициллина, ампициллина, полимиксина В, ко-тримоксазола, доксициклина, ципрофлоксацина, энрофлоксацина, моксифлоксацина, цефалексина, цефоперазона, цефтриаксона,

17. Отношение к гомо- и гетерологичным фагам (профаги): не определялось

18. Генетические характеристики: при секвенировании последовательности гена 16S рРНК показана 100% гомология анализируемой последовательности образца с нуклеотидной последовательностью гена 16S рРНК *Mannheimia haemolytica* (GenBank KU517779.1, CP005972.1 и др.)

19. Дополнительные сведения:

*Описание рекомбинантной плазмиды: не определялось

*Сведения о клонированной ДНК: не определялось

****Производственные показатели:** Экспериментальные серии препарата были произведены ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко.

*****Протективная активность:** Иммунизация крупного рогатого скота монопрепаратом, произведённым из штамма КЛ-ВИЭВ на основе масляного адъюванта при подкожном способе введения позволила получить средний титр антител равный 1:320, при повторной вакцинации средний титр антител составил 1:1360. Иммунизация мелкого рогатого скота монопрепаратом, произведённым из штамма КЛ-ВИЭВ на основе масляного адъюванта при подкожном способе введения позволила получить средний титр антител равный 1:295, при повторной вакцинации средний титр антител составил 1:1080.

Прочие: Фрагмент анализируемой нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК:

>16S12-16S1 sequence exported from 16S12-16S1.ab1

CGGTAGCTAATACCGCGTAATGTCTTAGGACTAAAGGGTGGGACCATTGTTGGCCACCTGCC
ATAAGATGAGCCCAAGTGGGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGCCCGCGA
TCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGGAACCCTGATGCAGCCATGCCG
CGTGAATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTTTCGGTGACGAGGAAGGCGATTGTT
TTAATAGAACAGTTCGATTGACGTTAATCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATAACTGGGCGTAAAGGGCACGC
AGGCGGTTGTTTAAGTGAGGTGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAATTGCATTTTCAGA
CTGGACAACCTAGAGTACTTTAGGGAGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAGCCCCCTTGGGAATGTACTGACGCTCATGT
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGCTGT
CGATTTGGGGATTGGGGTTAACTCTGGTGCCTGCTAGCTAACGTGATAAATCGACCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTC

20. Условия культивирования: микроорганизм растёт на большинстве бульонных питательных сред, используемых в биопроизводстве. Максимальное накопление бактериальной массы наблюдается при использовании для глубинного культивирования сердечно-мозговой среды. Оптимальным значением pH при глубинном культивировании является диапазон 7,2-7,8, а суб-оптимальным значения $\leq 7,1$ и $\geq 7,9$. Оптимальная температура для культивирования 37 °C.

21. Условия хранения: в лиофилизированном виде в ампулах. Объём лиофилизата составляет 1 см³.

22. Литературные ссылки: Laishevcev 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. DOI: 10.18551/rjoas.2016-06.09

В публикации штамм имеет название "Mannheimia haemolytica № KAB mh-1".

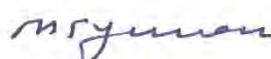
23. Организация-депозитор: ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко Москва, Рязанский проспект 24 к1.

24. Авторы: Капустин Андрей Владимирович, кандидат ветеринарных наук; Лашиевцев Алексей Иванович

25. Форма депонирования: национальное патентное депонирование

« 11 » сентября 2017 г.

Директор ФГБНУ ВИЭВ им Я.Р. Коваленко,
доктор ветеринарных наук, профессор,
академик Российской академии наук (РАН),
заслуженный деятель науки Российской
Федерации



Гулюкин М.И.

Свидетельство о депонировании штамма *Mannheimia haemolytica* в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА	
ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР «ГКПМ – ОБОЛЕНСК»	
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» (ФБУН ГНЦ ПМБ)	
142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск. Тел. 36-00-03, факс 36-00-10, код (4967), E-mail: info@obolensk.org, http://www.obolensk.org	
СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ	
№ 53	«25» июля 2017 года
Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировала для целей национальной патентной процедуры <u>25 июля 2017 года</u> авторский штамм микроорганизма <i>Mannheimia haemolytica</i> КЛ-ВИЭВ.	
Область применения штамма: штамм бактерий <i>Mannheimia haemolytica</i> КЛ-ВИЭВ для изготовления инактивированных вакцин против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота.	
Депозитор: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно - исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» (ФГБНУ ВИЭВ).	
109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корпус 1. Тел./ факс 970-03-69, код (495), E-mail: admin@viev.ru	
Автор (ы): Капустин Андрей Владимирович, к.в.н.; Лаишевцев Алексей Иванович.	
Штамму присвоен регистрационный номер: В-8139	
Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.	
Директор	И.А. Дятлов
Заведующий отделом коллекционных культур	А.Г. Богун

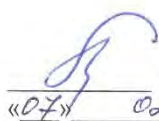
Приложение 5.

СТО 00496165-0003-2017 Производственные и контрольные штаммы *Mannheimia haemolytica* (метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТАНДАРТ ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора ФГБНУ ВИЭВ
им Я.Р. Коваленко по научной работе
Доктор биологических наук, профессор


А.Д. Забережный
«07» 02 2017 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЭВ
им Я.Р. Коваленко
Доктор ветеринарных наук, профессор
Академик Российской академии наук (РАН)
Заслуженный деятель науки
Российской Федерации



М.И. Гулюкин
«10» 02 2017 г.

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ И КОНТРОЛЬНЫЕ ШТАММЫ
MANNHEIMIA HAEMOLYTICA
(метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТО 00496165-0003-2017

МОСКВА 2017

Приложение 6.

Промышленный технологический регламент на производство и контроль вакцины
против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной
эмульгированной «Манхемвак»

ООО «ВЕТБИОХИМ»

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Ветбиохим»
А.В. Кривонос

«*14*» *августа* 2017 г.



**ПРОМЫШЛЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ**

НА ПРОИЗВОДСТВО И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ
МАНХЕЙМИОЗА КРУПНОГО И МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА
ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ
«МАНХЕМВАК»

Москва – 2017 г.

Приложение 7.

СТО 00496165-0004-2017. Вакцина против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированная эмульгированная «Манхемвак»

СТАНДАРТ ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора ФГБНУ ВИЭВ им
Я.Р. Коваленко по научной работе
Доктор биологических наук, профессор


А.Д. Забережный
«20» 03 2017 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЭВ
им Я.Р. Коваленко
Доктор ветеринарных наук, профессор
Академик Российской академии наук
(РАН)
Заслуженный деятель науки Российской
Федерации


М.И. Гулюкин
«13» 03 2017 г.

**Вакцина против мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота
инактивированная эмульгированная «Манхемвак»**

СТО 00496165-0004-2017

МОСКВА 2017

Временная инструкция по применению вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЭВ им Я.Р. Коваленко
Доктор ветеринарных наук, профессор
Академик Российской академии наук (РАН)
Заслуженный деятель науки Российской Федерации



М.И. Гулюкин
«15» июня 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота
инактивированной эмульгированной
«МАНХЕМБАК»

(Организация – разработчик: ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко")

I. Общие сведения

1. Торговое наименование - «МАНХЕМБАК».

Международное непатентованное наименование – Вакцина против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированная эмульгированная.

2. Лекарственная форма – суспензия для инъекций. Вакцина изготовлена из инактивированных формалином протективных антигенов Mannheimia haemolytica (штамм КЛ-ВИЭВ) и монтанида ISA 70 в качестве масляного адьюванта.

3. По внешнему виду вакцина представляет собой однородную эмульсию белого цвета. При длительном хранении допускается незначительное отслоение адьюванта над не расслаивающейся эмульсией. При встряхивании вакцина приобретает однородную структуру. Срок годности вакцины – 12 месяцев с даты выпуска. По истечении срока годности вакцина к применению не пригодна. Вакцину необходимо использовать в день вскрытия флакона.

4. Вакцина расфасована по 100 мл (50 доз) в стерильные полимерные флаконы соответствующей вместимости, укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками. Флаконы упакованы в картонные или пенопластовые коробки (ящики) с разделительными перегородками, обеспечивающими сохранность вакцины. В каждую коробку с вакциной вкладывают несколько экземпляров инструкции по применению.

5. Вакцину хранят и транспортируют в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С.

6. Вакцину следует хранить в местах, недоступных для детей.

7. Вакцину во флаконах без этикеток, с нарушенной укупоркой и целостностью, измененным цветом, содержащие посторонние примеси, подвергшуюся замораживанию, а также не использованную в день вскрытия флакона, выбраковывают и обезвреживают путем кипячения в течение 15 мин с последующей утилизацией. Утилизация обезвреженного препарата не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

8. Вакцина отпускается без рецепта.

II. Биологические свойства

9. Вакцина против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированная эмульгированная – иммунобиологический лекарственный препарат.

10. Вакцина вызывает формирование иммунитета к Mannheimia haemolytica, через 14 дней после повторного введения, который сохраняется не менее 8 месяцев. Колостральный иммунитет у молодняка, полученного от иммунизированных животных, сохраняется до 21 дня.

Вакцина безвредна, лечебными свойствами не обладает.

III. Порядок применения

11. Вакцина предназначена для профилактики мангеймиоза у крупного и мелкого рогатого скота всех возрастных групп в хозяйствах, неблагополучным по указанному заболеванию.

12. Запрещено иммунизировать клинически больных и/или ослабленных животных.

13. При работе с вакциной следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными препаратами ветеринарного назначения.

Все лица, участвующие в проведении вакцинации должны быть одеты в спецодежду (резиновые сапоги, халат, брюки, головной убор, резиновые перчатки) и обеспечены очками закрытого типа. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

При попадании вакцины на кожу и/или слизистые оболочки их рекомендуется промыть большим количеством водопроводной воды. При случайном введении препарата человеку место введения необходимо обработать 70% раствором этилового спирта, обратиться в медицинское учреждение.

14. Не допускается проведение вакцинации животных позже, чем за две недели до отёла или окота, а также лактирующих животных.

15. Вакцину вводят подкожно, коровам в дозе 3 см³, телятам в дозе 2 см³ в область средней трети шеи, овцам и козам всех возрастных групп препарат вводится подкожно в область внутренней поверхности бедра в дозе 2 см³.

Схемы вакцинации животных могут быть следующими:

№1. Стельных коров вакцинируют дважды: первый раз не позднее чем за 45 дней до отёла, вторая вакцинация проводится спустя 21 день после первой, но не позднее чем за 14 дней до отёла. Телят, полученных от ранее вакцинированных животных, и от не вакцинированных прививают на 7-10 день жизни двукратно с интервалом 21 день. Ревакцинация телят проводится однократно в возрасте 6 месяцев установленной инструкцией дозой.

№2. Суягных овец и коз вакцинируют дважды: первый раз не позднее чем за 45 дней до отёла, вторая вакцинация проводится спустя 21 день после первой, но не позднее чем за 14 дней до отёла. Приплод полученных от ранее вакцинированных животных и от не вакцинированного прививают на 7-10 день жизни двукратно с интервалом 21 день. Ревакцинация молодняка проводится однократно в возрасте 6 месяцев установленной инструкцией дозой.

№3. Все поголовье мелкого рогатого скота старше года вакцинируют каждые 6 месяцев двукратно с интервалом 21 день.

Вакцинацию проводят с соблюдением общепринятых правил асептики, для инъекции используют только стерильные материалы и инструменты. Для каждого животного используют отдельную иглу. Перед применением флаконы с вакциной тщательно взбалтывают.

16. При применении вакцины в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не отмечается.

После введения вакцины у отдельных животных возможно кратковременное повышение температуры тела и/или местная воспалительная реакция, исчезающая через 1-3 суток. Появляющаяся у отдельных животных аллергическая реакция на введение препарата не может быть основанием для предъявления рекламации.

17. Симптомов мангеймиоза, а также других патологических признаков при передозировке вакцины не выявлено.

18. Вакцину не применяют в одном шприце с другими биопрепаратами и лекарственными средствами.

19. Особенности поствакцинальной реакции при первичной и повторной вакцинации не установлено.

20. Следует избегать нарушений схемы вакцинации, поскольку это может привести к снижению эффективности иммунопрофилактики мангеймиоза животных. В случае пропуска повторного введения вакцины необходимо провести иммунизацию как можно скорее. В таких случаях используют двукратную схему вакцинации в указанной дозе.

21. Продукты убоя от вакцинированных животных используют без ограничений.

Протокол клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины «Манхемвак» против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной в условиях СПА «Колхоз имени Ворошилова»

Утверждаю
Председатель СПА «Колхоз имени Ворошилова»
О.В. Шатохин

Протокол
клинических испытаний безвредности, активности и
эффективности вакцины «МАНХЕМВАК» против манхеймиоза крупного и мелкого
рогатого скота инактивированной

г. Новоалександровск
Ставропольский край

«24» мая 2017 г

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.Коваленко», в лице директора Гулюкина М.И., действующего на основании Устава, именуемый в дальнейшем «Заказчик», с одной стороны, и

Сельскохозяйственная производственная артель «Колхоз имени Ворошилова», именуемый в дальнейшем «Исполнитель», в лице Председателя СПА «Колхоз имени Ворошилова» Шатохина О.В. с другой стороны, составили настоящий Протокол о нижеследующем:

Исполнитель по поручению заказчика провел клинические испытания вакцины инактивированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота «Манхемвак» (серия 1, срок годности до 02.2018 г.), по следующим показателям:

- Безвредность, иммуногенная активность, специфическая эффективность.

1. Определение безопасности введения «Вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота «МАНХЕМВАК» инактивированной», серии №1 в рекомендованной дозе при однократном применении для молодняка крупного рогатого скота.

Для проведения опыта сформировано две группы телят чёрно-пёстрой породы в возрастной категории 7-10 дней полученных от не вакцинированных ранее животных. Общее количество животных составило 34 головы, среди которых 22 телочки, и 12 бычков. В качестве контроля из 34-ёх телят две телочки и два бычка не были вакцинированы.

Вакцину телятам вводили внутримышечно в область средней трети шеи с правой стороны в объёме 2 см³. Для соблюдения «чистоты эксперимента» всем контрольным животным был введён стерильный физиологический раствор, аналогичным для соответствующей группы животных методом и объёмом. Выполнение всех манипуляций было проведено в соответствии с необходимой степенью стерильности, то есть предварительной обработкой места инъекции и использования стерильных шприцов с иглами.

Длительность наблюдения за вакцинированными животными составила 14 дней, в течение которых проводился клинический осмотр животного и места инъекции, а также термометрия. При выполнении опыта было установлено следующее:

Введение вакцины «Манхемвак» и физиологического раствора в дозе 2 см³ молодняку крупного рогатого скота принадлежащего СПА «Колхоз имени Ворошилова» Новоалександровского района Ставропольского края не вызывало у телят опытной и контрольной групп значительного повышения температуры тела, показатели которой оставалась в пределах физиологической нормы.

Протокол клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины «Манхемвак» против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инаktivированной в условиях ЗАО "Племрепродуктор "Васильевское"

Утверждаю
Генеральный директор ЗАО "Племрепродуктор "Васильевское"



С.М. Горячев

Протокол

клинических испытаний безвредности, иммуногенной активности и эффективности вакцины «МАНХЕМВАК» против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инаktivированной

Московская область
Сергиево-Посадский район,
Васильевский сельский округ

«16» июня 2017 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко», в лице директора Гулокина Михаила Ивановича, действующего на основании Устава, именуемый в дальнейшем «Заказчик», с одной стороны, и

Закрытое акционерное общество «Племрепродуктор «Васильевское», именуемый в дальнейшем «Исполнитель», в лице Генерального директора ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» Горячева Сергея Маратовича с другой стороны, составили настоящий Протокол о нижеследующем:

Исполнитель по поручению заказчика провел клинические испытания вакцины инаktivированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота «Манхемвак» (серия 2, срок годности до 05.2018 г.), по следующим показателям:

- Безвредность, антигенная активность, специфическая эффективность.

1) Определение безопасности введения «Вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота «МАНХЕМВАК» инаktivированной», серии №2 в рекомендованной дозе при однократном применении для молодняка крупного рогатого скота.

Для проведения опыта было сформировано две группы телят чёрно-пёстрой породы в возрастной категории 7-10 дней полученных от не вакцинированных ранее животных. Общее количество животных составило 46 голов, среди которых 28 тёлочки, и 18 бычков. В качестве контроля из 46-ёх телят две тёлочки и два бычка не подвергались вакцинации.

Вакцину телятам вводили подкожно в область верхней трети шеи с правой стороны в объёме 2 см³. Для соблюдения «чистоты эксперимента» всем контрольным животным был введён стерильный физиологический раствор, аналогичным для соответствующей группы животных методом и объёмом. Выполнение всех манипуляций было проведено в соответствии с необходимой степенью стерильности, то есть предварительной обработкой места инъекции и использования стерильных шприцов с иглами.

Длительность наблюдения за вакцинированными животными составила 14 дней, в течение которых проводился клинический осмотр животного и места инъекции, а также термометрия. При выполнении опыта было установлено следующее:

Введение вакцины «Манхемвак» и физиологического раствора в дозе 2 см³ молодняку крупного рогатого скота принадлежащего ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» не вызывало у телят опытной группы серьёзных побочных эффектов, тем не менее было отмечено краткосрочное повышение температуры тела животного, в сравнении со значением данного показателя до вакцинации. Так до введения препарата средняя температура тела животных была 38,2 °С, спустя 12 часов после вакцинации средняя температура увеличилась до 39,0 °С, то есть изменение составило 0,8 °С. При этом стоит принять к сведению, что полученные значения входят в диапазон нормативного значения для животных данной возрастной группы - +38,5...+40,2 °С. Отмечено отсутствие каких-либо системных нежелательных последствий введения препарата: у животных не наблюдалось признаков угнетения, снижения аппетита, адинамии. При пальпации места инъекции отмечено образование уплотнения на месте введения который самостоятельно рассасывался в течение 4-5 дней.

Протокол клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины «Манхемвак» против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инаktivированной в условиях ООО «Колхоз Гжельский»

Утверждаю

Директор ООО «Колхоз Гжельский»



Ю.В. Матюшкин

**Протокол
клинических испытаний безвредности, активности и
эффективности вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота
инаktivированной эмульгированной «МАНХЕМВАК»**

д. Ариново Раменский район
Московская область

«09» июня 2017 г

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко», в лице директора Гулюкина Михаила Ивановича, действующего на основании Устава, именуемый в дальнейшем «Заказчик», с одной стороны, и общество с ограниченной ответственностью «Колхоз Гжельский», именуемый в дальнейшем «Исполнитель», в лице директора Матюшкина Юрия Викторовича с другой стороны, составили настоящий Протокол о нижеследующем:

Исполнитель по поручению заказчика провел клинические испытания вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инаktivированной эмульгированной «Манхемвак» при подкожном введении (серия 2, срок годности до 05.2018 г.), по следующим показателям:

- Безвредность, антигенная активность, специфическая эффективность.

1. Определение безопасности введения «Вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инаktivированной эмульгированной «МАНХЕМВАК», серии №2 в рекомендованной дозе при однократном применении для молодняка мелкого рогатого скота.

Для проведения опыта было сформировано две группы козлят, по 12 голов в каждой группе, в возрастной категории 7-10 дней полученных от не

Акт клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины «Манхемвак» против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной в условиях вивария ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко



Утверждаю

Директор
ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко

М.И. Гулюкин

**АКТ
клинических испытаний безвредности, активности и
эффективности вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота
инактивированной эмульгированной «МАНХЕМВАК»**

г. Вышний Волочек
Тверская область

«4» июля 2017 г

В рамках выполнения государственного задания «Разработка технологии изготовления и методов контроля инактивированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота» (№ 0578-2016-0002), исполнителем которого является Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко», комиссионно был составлен настоящий акт по проведению клинических испытаний вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак» при внутримышечном введении (серия 1, срок годности до 02.2018 г.), по показателю безвредность, антигенная активность, специфическая эффективность.

1. Определение безопасности введения «Вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «МАНХЕМВАК», серии №1 в рекомендованной дозе при однократном применении для молодняка мелкого рогатого скота.

Для проведения опыта было сформировано две группы ягнят, в опытной группе было 4 ягнёнка, а в контрольной 2, в возрастной категории 7-10 дней, полученных от не вакцинированных ранее животных. Общее количество животных составило 6 голов.

Вакцину ягнятам вводили внутримышечно в область средней трети шеи в объёме 2 см³. Для соблюдения «чистоты эксперимента» всем контрольным животным был введён стерильный физиологический раствор, аналогичным для соответствующей группы животных методом и объёмом. Выполнение всех манипуляций было проведено в соответствии с необходимой степенью стерильности, то есть предварительной обработкой места инъекции и использования стерильных шприцов с иглами.

Длительность наблюдения за вакцинированными животными составила 14 дней, в течение которых проводился клинический осмотр животного и места инъекции, а также термометрия. При выполнении опыта было установлено следующее:

Введение вакцины «Манхемвак» и физиологического раствора в дозе 2 см³ молодняку мелкого рогатого скота, принадлежащего ФГБНУ ВИЭВ, не вызывало у животных опытной и контрольной

Рисунок 12 – поголовье крупного рогатого скота на территории Российской Федерации 2015-2016 г.

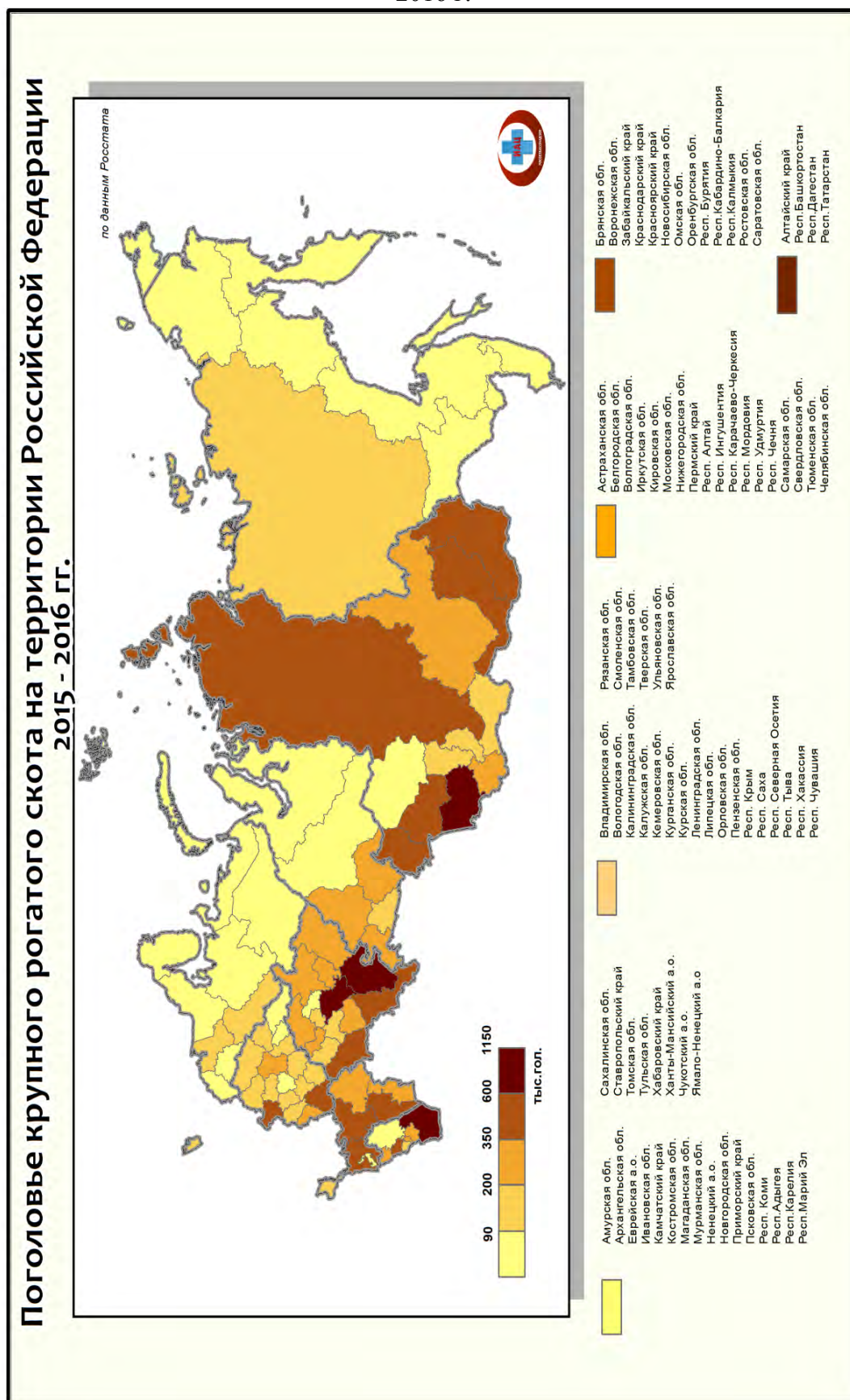


Рисунок 13 – Поголовье мелкого рогатого скота на территории Российской Федерации 2015-2016 г.

