

Лаишевцев Алексей Иванович

**Клинико-эпизоотологическое обоснование
вакцинопрофилактики и разработка вакцины против
мангеймиоза 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)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

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

Официальные оппоненты:

Глотова Татьяна Ивановна – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН.

Сусский Евгений Владимирович - доктор биологических наук, Лауреат государственной премии правительства в области науки и техники, ФГУП «Армавирская биофабрика», директор.

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Защита диссертации состоится « ___ » _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02, действующего на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект 24 к.1., тел.: 8(495)970-03-68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://viev.ru>.

Автореферат разослан " ___ " _____ 2018 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук**

И.Ю. Ездакова

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Животноводство – стратегическая отрасль сельского хозяйства, обеспечивающая продовольственную независимость страны молочной и мясной продукцией (Clarke JM. 2001; Haji Hajikolaei M. 2010; Hendriksen R.S. 2008). 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 (Аблов А.М. 2013; Джупина С.И. 2016; Мальцева Б.М. 2001; Осипова Н.И. 2011, Капустин А.В., 2016). В соответствии с современными сведениями о данном заболевании его возбудителями являются два различных вида микроорганизмов – *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* (Лях Ю.Г. 2013; Cassirer E.F., 2001; Fett, T. 2009; Панин А.Н. 2012; Ханеев В. 2015).

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 (Душук Р.В. 1987; Шегидевич Э.А., 1984; Каан О., 2010; Капустин А.В., 2016). Возбудитель *Mannheimia haemolytica* известен в научных и учебно-методических работах отечественных специалистов как *Pasteurella haemolytica* и, наряду с бактериями вида *Pasteurella multocida*, признается 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 эпизоо-

тического процесса, клинико-морфологических 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, профилирования и лечения необходимым является всестороннее изучение каждой патологии в индивидуальности [Панин, А.Н., 2012; Семенцов В.И., 2008; Ханеев В., 2015; Czuprynski C.J., 1991; Hilwig R.W., 1985]. Так, в настоящее время достаточно изучены особенности пастереллёза вызванном *Pasteurella multocida*, но систематизированных данных об инфекционной патологии, спровоцированной *Mannheimia haemolytica* не хватает [Шибяев, М.А., 2007; Щербаков, А.В., 2007]. В Российских научных данных сложно найти особенности течения и проявления манхемия-инфекции, её диагностирования, лечения и профилирования. В частности, остаются недостаточно изученными вопросы формирования иммунитета и иммунопрофилактики пастереллёза, вызванного бактериями вида *Mannheimia haemolytica* – манхеймиоза [Botcher L., 1988; Chae C.H., 1990; Majury A.L., 1991; Pandher K., 1998; Styrt V., 1990]. Не доказана возможность и эффективность профилирования пастереллёза, вызванного бактериями *Mannheimia haemolytica*, биопрепаратами, содержащими антиген *Pasteurella multocida* и наоборот [Лях Ю.Г., 2013]. 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 манхемия-

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 инактивированной 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 инактивированной 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 инактивированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота;
7. Разработать методы контроля инактивированной вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота;
8. Провести производственные испытания экспериментальной серии вакцины инактивированной 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 инактивированной 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 вакци-

ны против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированной эмульгированной «Манхемвак». Вакцина и способ её применения позволят 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 инактивированного 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-производственного штаммов, разработка технологического процесса изготовления и методов контроля вакцины инактивированной 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. Ос-

новные 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 клинико-морфологического 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.

Собственные исследования

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».

Изучение эпизоотической ситуации, клиническое обследование животных, патологоанатомические исследования трупов павших животных, взятие материала для лабораторных исследований проводили на сельскохозяйственных предприятиях 20 регионов РФ. 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» Ставропольского края, ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» и ООО «Колхоз Гжельский» Московской области, вивария ФГБНУ ВИЭВ.

В работе были использованы коллекционные, музейные, производственные штаммы и полевые изоляты бактерий семейства Pasteurellaceae и других видов бактерий, а также питательные среды, химические реактивы, лабораторная посуда и оборудование, животные. Изучение эпизоотической ситуации проводили на основании общедоступных данных предоставляемыми структурными подразделениями Россельхознадзора, а также на основании результатов собственных исследований.

Бактериологические исследования для выделения бактерий рода *Pasteurella* и *Mannheimia* были проведены согласно методическим указаниям по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц № 22-7/82 от 20.08.1992 г. Макроскопическое исследование органов и тканей проводили согласно «Методическим указаниям по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях».

Эпизоотологические данные и клинико-морфологическое проявление и мангеймиоза крупного и мелкого рогатого скота

При обследовании 21 неблагополучного пункта в двух случаях установлен диагноз мангеймиоз на основании доказательства этиологической роли возбудителя *Mannheimia haemolytica*, еще в 3 случаях *M. haemolytica*

выделена в монокультуре из паренхиматозных органов, но патогенность в биопrobe доказать не удалось.

Установлено, что больные животные проявляют малоподвижность, исхудание, сухой кашель, постепенно переходящий в продуктивный. Отделяемая мокрота содержала отторгнутый эпителий бронхов, слизь, серозный экссудат. Слизистые оболочки ротовой полости и носовых ходов гиперемированы. Из носовых ходов больных животных, преимущественно молодняка, отмечали обильные слизистые, серозно-слизистые выделения.

Установлено, что к манхеймиозу наиболее восприимчивы телята в возрасте до 6-ти месяцев и ягнята до трёх месяцев. У ягнят также отмечали признаки катарального энтерита, кератоконъюнктивита. При проведении патологоанатомического вскрытия у молодняка превалировали 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 коров свойственно снижение молочности. При вскрытии подкожная соединительная ткань имела петехиальные геморрагии, у некоторых отмечали увеличение надвымянных и бронхиальных лимфоузлов, их отёчность, гиперемию с инъекцией сосудов и петехиями, напряженностью капсулы. В 17 % случаев регистрировали скопление жидкости соломенно-желтого цвета в брюшной полости, в 9 % – серозно-геморрагический выпот. Грудная полость в большинстве случаев содержала жидкость соломенно-желтого цвета объемом от 300 до 1500 мл.

Изученные случаи манхеймиоза позволили нам критеризировать эпизоотологические аспекты болезни: отмечена осенне-зимне-весенняя сезонность, эпизоотической вспышке способствуют: неполноценное кормление, гиповитаминозы, переболевание диспепсией в молочный период, технологические стрессы, скученность содержания, нарушение зоогигиенических норм содержания, повышенная влажность и т.д. Для манхеймиоза характерно персистирование возбудителя на восприимчивом поголо-

вье, 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.

Биологические свойства изолятов *Mannheimia haemolytica*

При проведении комплексного бактериологического исследования проб клинического и/или патологического материала были выделены и идентифицированы 16 изолятов *Pasteurella multocida*, 5 изолятов *Mannheimia haemolytica*, а также по 1 изоляту *Pasteurella aerogenes*, *Mannheimia glucosida*, *Vibersteinia trehalosi*. Выделенные изоляты *M. haemolytica* имели типичные культуральные, морфологические, тинкториальные и биохимические свойства.

Определение серотипа манхемий проводилось в реакции непрямой гемагглютинации с использованием штаммов с известными свойствами, а именно относящихся к серотипу А1, по методике предложенной Е.Л. Биберстейном. Для получения антисывороток использовали морских свинок массой 350-450 г. Сыворотки, полученные от гипериммунизированных животных штаммом №169, демонстрировали положительную реакцию агглютинации со штаммами КАВ-1, №217, №169 и КМИЭВ-В158 в разведении 1:128, 1:32, 1:256 и 1:128 соответственно. Остальные штаммы агглютинировали в низком разведении. Сыворотка, полученная от животных, гипериммунизированных штаммом КМИЭВ-В158, демонстрировала положительную реакцию агглютинации со штаммами КАВ-1, №217, №169 и КМИЭВ-В158 в разведениях 1:128, 1:16, 1:64, 1:512 соответственно. Сыворотка, полученная от гипериммунизированных животных штаммом АТСС 33396, демонстрировала положительную реакцию агглютинации со штаммами АТСС 33396 и АМ9 в разведениях 1:512 и 1:128 соответственно.

Таким образом, штаммы *M. haemolytica* №169, КМИЭВ-В158, КАВ-1 и №217 имеют одинаковый капсульный антиген, что говорит об их принадлежности к серотипу А1. Штамм АМ9 проявляет схожесть по кап-

сильному антигену со штаммом АТСС 33396, что позволяет его отнести к серотипу А2.

Изучение патогенных и вирулентных свойств изолятов *Mannheimia haemolytica* позволило произвести подбор наиболее подходящих штаммов для последующего использования их в качестве производственных и контрольно-производственных. Для данного исследования были использованы иммунодефицитные линии мышей, а также мыши, подвергнувшиеся предварительной иммуносупрессии дексаметазоном. В обоих случаях удалось доказать патогенность изолятов КАВ-1, №217, для которых показатель вирулентности составил $LD_{50}=3,5 \times 10^8$ и $4,8 \times 10^8$ мкр. кл. соответственно.

Антигенные свойства изолятов патогенных манхеймий изучали на морских свинках, формируя группы по 5 голов в каждой, из которых первая группа была иммунизирована моновакциной, изготовленной из штамма *M. haemolytica* КАВ-1, вторая – монопрепаратом из штамма *M. haemolytica* №217, третья группа являлась контрольной. Препараты были скомпонованы на гидроксиде алюминия (ГОА). Введение препаратов опытным группам животных проводили двукратно с интервалом 21 день подкожно в объёме 1 см^3 , концентрация бактериальных клеток в 1 см^3 – 6 млрд. мкр. кл.

Средний титр антител у животных, подвергшихся первой иммунизации антигеном *M. haemolytica* КАВ-1, составил 1:360, антигеном №217 – 1:260. Повторная иммунизация антигеном *M. haemolytica* КАВ-1 позволила увеличить титры антител до 1:960, в то время как *M. haemolytica* №217 составило 1:720. У всех животных контрольной группы, которым вводили физиологический раствор, на всех этапах опыта титров антител к *M. haemolytica* не выявляли.

Штаммы *M. haemolytica* КАВ-1 и №217 были паспортизированы и депонированы в музее типовых культур ФГБНУ ВИЭВ как контрольно-производственные, а также в государственной коллекции ФБУН «ГНЦ ПМБ» под наименованием «КЛ-ВИЭВ» с регистрационным номером В8139 от 25.07.2017.

Разработка технологии изготовления и методов контроля вакцины инактивированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота

Реализацию пилотного проекта по созданию вакцины против манхеймиоза начинали с оптимизации методов культивирования бактерий *M. haemolytica* в лабораторных и промышленных условиях. Установлено, что наибольшая концентрация бактериальной массы 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.

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 проводили добавление 40 %-ного раствора глюкозы из расчёта 0,5 % к объёму культивируемой массы 1 раз в 5 часов при постоянной рН-метрии и выравнивании значения до 7,2-7,8 добавлением 10 %-ного раствора гидроксида натрия. Дополнительно вносили 5 % дрожжевой экстракт, 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота и ¼ добавки Naemophilus Growth Supplement FD117 в качестве стимулятора роста.

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

Концентрирование клеток *M. haemolytica* проводили путём сепарирования инактивированной бульонной культуры с использованием сепаратора непрерывного действия (Alfa Laval) с производительностью от 200 литров в час или с использованием центрифуги Treewe 6lr с соответствующим режимом.

Для определения оптимальной вакцинальной дозы, способной вызвать формирование напряженного стойкого иммунитета, проводили вакцинацию морских свинок вариантами пилотного препарата с концентрацией бактериального антигена 9×10^9 , $7,5 \times 10^9$, 6×10^9 , $4,5 \times 10^9$, 3×10^9 мкр. кл., вы-

полненными на основе различных адьювантов – гидроксида алюминия (ГОА) в соотношении 1/9, полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ-6000) в соотношении 1/9, акрипола 971p в соотношении 1/9 и масляного адьюванта Montanide ISA 70 в соотношении 1/1. Параллельно оценивали безвредность и реактогенность образцов. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты подбора адьюванта для изготовления инактивированной вакцины против крупного и мелкого рогатого скота при двукратном введении

Концентрация	Группа	ГОА	Группа	ПЭГ-6000	Группа	Акрипол 971p	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, представленных в таблице 1, выполненные на основе ГОА, ПЭГ-6000 и акрипола препараты при подкожном способе введения, а также ГОА и ПЭГ-6000 при внутримышечном введении демонстрируют нежелательные побочные эффекты, в дальнейшем они не рассматривались для изучения.

Определение антигенной активности проводили в РА с сыворотками, полученными после первой и второй вакцинации от лабораторных животных при реализации предыдущего опыта. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Антигенная активность вариантов вакцины на основе различных адьювантов при разных способах введения

Концент- рация ан- тигена	Акрипол 971р / внутримышечное введение		Montanide ISA 70 / подкожное введение		Montanide ISA 70 / внутримышечное введение	
	Средний титр антител					
	1-ая вакцинация	2-ая вакцинация	1-ая вакцинация	2-ая вакцинация	1-ая вакцинация	2-ая вакцинация
3x10 ⁹	1:150	1:400	1:300	1:1200	1:300	1:1200
4,5x10 ⁹	1:200	1:600	1:150	1:600	1:200	1:800
6x10 ⁹	1:150	1:300	1:300	1:1200	1:300	1:1200
7,5x10 ⁹	1:150	1:400	1:200	1:1200	1:300	1:600
9x10 ⁹	1:300	1:600	1:300	1:1200	1:400	1:1200

Как видно из полученных данных, наибольшей антигенной активностью обладает препарат, выполненный на основе масляного адьюванта Montanide ISA 70 с минимальным содержанием бактериального антигена 3 млрд. мкр. кл. в 1 см³ при подкожном и внутримышечном способе введения – средний титр антител после двукратной вакцинации составил 1:1200. Увеличение содержания антигена в иммунизирующей дозе не приводит к существенному возрастанию титра антител.

После обоснования оптимальной иммунизирующей дозы манхеймиозного антигена для крупного и мелкого рогатого скота, а также целесообразности использования масляного адьюванта Montanide ISA 70, нами была разработана технологическая схема изготовления инактивированной вакцины. Этапы производственного цикла вакцины инактивированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота приведены на рисунке 1.

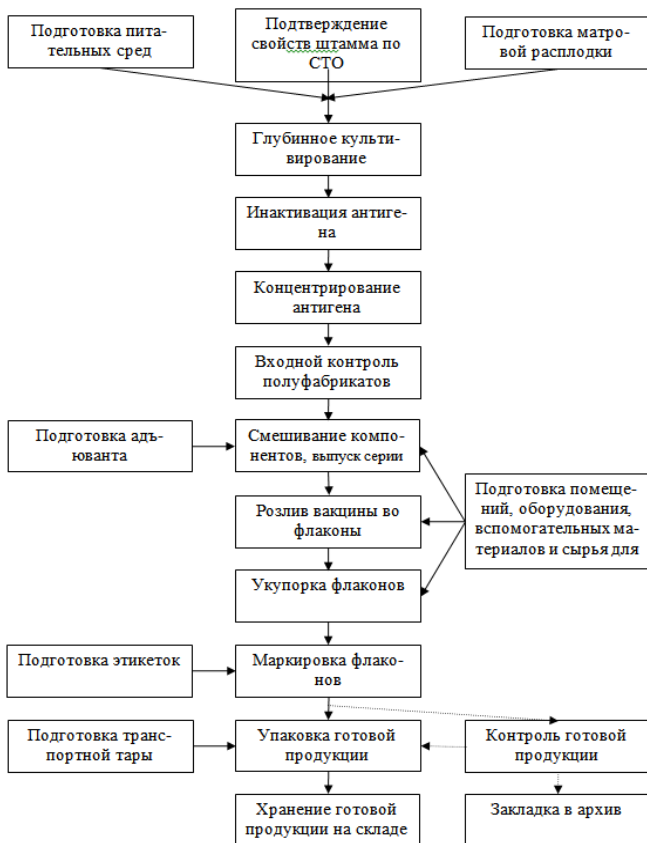


Рис. 1 - Технологическая схема производства вакцины инактивированной против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота

Разработанные биотехнологические параметры были внесены в стандарт организации – СТО 00496165-0003-2017 Вакцина против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота инактивированная эмульгированная «Манхемвак». Для проведения контроля разработанного биопрепарата были определены следующие критерии: внешний вид, цвет; наличие посторонних примесей, трещин флаконов, нарушение маркировки, качества укупорки; концентрация водородных ионов (рН) в пределах 7,0-7,7; стерильность; безвредность (для морских свинок); антигенная активность; стабильность эмульсии; вязкость. Экспериментальные серии препарата соответствовали требованиям СТО. Серией испытаний установлена безвредность и ареактогенность готового препарата в оптимальной

иммунизирующей дозе (3,0 млрд. мкр. кл. в 1 см³) для лабораторных и естественно восприимчивых животных.

Безопасность применения пилотного биопрепарата изучали при однократном и двукратном введении рекомендуемой дозы, а также дозы, двукратно превышающей рекомендуемую, телятам и козлятам в различном физиологическом состоянии. Установлено, что введение (1 и 2) «Манхемвак» в дозах 2 и 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 исчезали самостоятельно в течение 24-72 часов.

При определении безвредности препарата для беременных животных изменение клинического статуса не выявляли. Температура тела оставалась в пределах физиологической нормы, отмечено ее повышение на $0,6 \pm 0,12$ °C у коров и $0,5 \pm 0,22$ °C у мелкого рогатого скота через 6 часов после вакцинации, которое нивелировалось в течении 24 часов. Небольшая отёчность в области инъекции с повышением местной температуры проходили в течение 24 часов. Отёк полностью рассасывался в течение 7 суток. После повторной вакцинации проявления были аналогичными.

После однократного введения двойной дозы у некоторых животных опытных групп было замечено снижение подвижности. Небольшой отёк в области инъекции рассасывался в течение 5-7 суток. Реализованные опыты подтвердили безвредность разработанного препарата на целевых видах животных при подкожном и внутримышечном способе введения.

Изучение протективной активности экспериментальных серий вакцины на лабораторных объектах

Для исследования протективных свойств разработанной вакцины был поставлен острый опыт на лабораторных животных. В качестве биологической модели использованы морские свинки массой 350-450 г. – две группы по 10 голов в каждой. Первая группа животных была опытной, животных иммунизировали в область холки препаратом «Манхемвак» в дозе 1 см³ двукратно с соблюдением 21-тидневного интервала между вакцинациями. Вторая группа свинок являлась контрольной и не была

подвергнута вакцинации. Спустя 14 дней после второй вакцинации опытных животных, животных обеих групп подвергнули интраназальному заражению клетками *M. haemolytica* №217 в дозе 0,2 мл с концентрацией 5 LD₅₀, т.е. 2,4 млрд. мкр. кл. в указанном объеме. В качестве заражающей культуры изначально был выбран штамм, не используемый при производстве биопрепарата. За инфицированными животными было установлено наблюдение в течение 14 дней.

При учете результатов у невакцинированных животных при патолого-анатомическом 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, что свидетельствует об эффективности препарата.

Антигенная активность биопрепарата на естественно восприимчивых видах животных

Опыты проводили с использованием двух серий препарата, выполненном на масляном адьюванте Montanide ISA 70 с концентрацией 3 млрд. мкр. кл. в 1 см³. Результаты определения антигенной активности «Вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота «Манхемвак» инактивированной эмульгированной» при различных способах введения на животных в группах по 10 голов приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Антигенная активность вакцины «Манхемвак» при внутримышечном и подкожном введении КРС и МРС

Период определения титров антител	Средний титра антител с оценкой два креста и выше в сыворотке крови восприимчивых животных			
	Серия №1 (в/м)		Серия №2 (п/к)	
	СПА «Колхоз имени Ворошилова», КРС, в/м	Виварий ФГБНУ ВИЭВ, МРС, в/м	ЗАО "Племрепродуктор "Васильевское", КРС, п/к	ООО «Колхоз Гжельский», МРС, п/к
После первой вакцинации	1:200	1:260	1:320	1:295
После второй вакцинации	1:720	1:800	1:1360	1:1080

Представленные данные отражают выраженную антигенную активность вакцинопрепарата. При постановке РА разведения сыворотки начинались с 1:25, более низкий уровень не определялся.

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.

Заключение

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 превалирующие 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 манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота.

5. Получено 5 эпизоотических изолятов бактерий *Mannheimia haemolytica*, которые изучены по культуральным, морфологическим, тинкториальным, биохимическим, 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 А1, 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 адьювант - 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 инъекции вакцины «Манхемвак» в производственных условиях скотоводческих и овцеводческих предприятий (средний титр антител после двукратного вакцинирования крупного рогатого скота составил 1:1360, а для мелкого ро-

гатового скота 1:1080), а также в лабораторно-производственных условиях вивария Вышневолоцкого филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

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. *gallinigena*; 5 штаммов *Mannheimia haemolytica*; 1 штамм *Pasteurella aerogenes*; 1 штамм *Mannheimia glucosida*; 1 штамм *Vibersteinia 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».

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Ветеринарным специалистам животноводческих предприятий и частных индивидуальных хозяйств рекомендуется проводить мониторинг манхеймиоза бактериологическими методами и совершенствовать лечеб-

но-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 инактивированную эмульгированную «Манхемвак» 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 вакцинопрепаратов против манхеймиоза.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Лаишевцев А.И.**, Капустин А.В., Якимова Э.А., Забережный А.Д., Искандаров М.И., Шабейкин А.А., Полякова И.В. Диагностика манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота // Методические указания. – 2017. – С. 25.
2. **Лаишевцев А.И.**, Капустин А.В., Пименов Н.В. Обзор современных средств специфической профилактики пастереллёза и манхеймиоза сельскохозяйственных животных // Ветеринария и кормление. – 2017. – № 3. С. 64-66.
3. **Лаишевцев А.И.**, Капустин А.В., Гулюкин А.М. 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 // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – № 63. – С.132-138.
4. Капустин А.В., **Лаишевцев А.И.**, Ездакова И.Ю., Скворцов В.Н., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей // Методические указания. 2016. – С. 29.
5. **Laishevtcev A.I.**, Kapustin A.V., Pimenov N.V. Specific identification of *Pasteurella* bacteria on the basis of biochemical properties in accordance with modern classification // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – Т. 61, № 1. – P.320-328.
6. **Laishevtcev A.I.** The results of the selection of *Mannheimia haemolytica*'s new strain "KI-Viev" for the production of specific prevention agents for manheimia of large and small cattle // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017/ - Т. 67, №7. – P.288-297.
7. **Laishevtcev A.I.** Pasteurellosis of farm animals: modern epizootic situation // Biotika. – 2016. April 2 (9). – P.41-43.
8. **Laishevtcev A.I.** Features of biochemical identification and differentiation of *Mannheimia haemolytica* // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2016. – Т. 54, № 6. – P.70-77.
9. **Laishevtcev A.I.** Actualization of principles and methods of laboratory diagnostics of Pasteurellosis of farm animals and birds // Biotika. – 2016. – February 1 (8). – P.44-49.
10. Капустин А.В., **Laishevtcev A.I.** Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia haemolytica* // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2016. – Т. 52, № 4. – P.3-12.