

2. На основе рекомбинантного антигена р65 разработана иммуоферментная тест-система для определения антител к *M. hyopneumoniae* в сыворотках крови свиней.

3. Установлено, что специфичность и

чувствительность разработанного теста относительно коммерческого набора «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX, США) составляет 95,6% и 96,7%, соответственно.

РЕЗЮМЕ

Экспрессией в *E. coli* получен рекомбинантный белок р65 *Mycoplasma hyopneumoniae*. На основе рекомбинантного антигена разработан непрямой вариант иммуоферментного анализа для выявления антител к *M. hyopneumoniae* в сыворотках крови свиней. Установлена очень хорошая согласованность ($k=0,97$) разработанной тест-системы и коммерческого набора «*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit» (IDEXX, США).

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae recombinant p65 protein was prepared by expression in *E. coli*. Indirect enzyme immunoassay has been developed on the basis of recombinant antigen, for the detection of antibodies to *M. hyopneumoniae* in porcine blood sera. Very good consistency ($k=0.97$) has been established between the developed test-system and commercial test kit “*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit” (IDEXX, USA).

Литература

1. О.Г. Грибанов, А.В. Щербаков, Н.А. Перевозчикова и др. Использование аэросила А-300 и фильтров GF/F (GF/C) для очистки фрагментов ДНК, ДНК-плазмид и РНК // Биохимия. 1996. Т. 21, № 6. С. 1064–1070.
2. Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 399 с.
3. S.N. Done. Enzootic pneumonia (mycoplasmosis) revisited // Pig J. 1996. V. 38. P. 40–61.
4. K. Cheikh, F. Sharek, S. Dea. Monoclonal antibodies to *Escherichia coli* — expressed p46 and p65 membraneous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2003. V. 10, № 3. P. 459–468.
5. F.C. Minion, E.J. Lefkowitz, M.L. Madsen et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis // J. Bacteriol. 2004. V. 186, № 21. P. 7123–7133.
6. E.L. Tracher. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* // Anim. Health Res. Rev. 2004. V. 5. P. 317–320.

УДК 619:616.98:579. 843. 95:578.74:616 – 097:470

О.И. Ручнова, О.В. Прунтова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОГО РОДСТВА ИЗОЛЯТОВ *PASTEURELLA MULTOCIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Введение

Пастереллезы — остро и хронически протекающие инфекционные болезни сельскохозяйственных животных и птиц. Широко распространены во всех странах мира. Экономический ущерб особенно велик при остром течении болезни, когда проводят вынужденный убой больных животных [1].

Pasteurella multocida является наиболее важным патогенным видом рода *Pasteurella*, который имеет широкий круг хозяев, включая большинство млекопитающих, птиц, а также человека. Этот микроорганизм является возбудителем геморрагической септицемии животных (серовариант В6), холеры птиц (серовариант А1 и А3), а также легочных пастереллезов (серогруппы А и Д), осложняющих респираторные инфекции вирусной и микоплазменной этиологии [2].

Основным звеном в системе мер борьбы с этим заболеванием является специфическая профилактика. Но для того, чтобы вакцины против пастереллеза были эффективны, в их состав должны входить те сероварианты пастерелл, которые вызывают вспышку заболевания.

Установлено, что антигенная структура пастерелл сложна и включает капсульный и соматический антигены. По современной классификации представители вида *P. multocida* подразделяются на 5 капсульных серогрупп (А, В, D, Е и F) и 16 серовариантов по соматическому антигену (с 1 по 16) [1]. В настоящее время большая часть референтных штаммов различных серовариантов пастерелл находится толь-

ко в коллекциях некоторых зарубежных лабораторий и исследователей и не доступны для приобретения. Коммерческие диагностикумы для идентификации пастерелл в РФ, как и в большинстве стран мира, не производятся.

Целью данной работы было изучение изолятов *P. multocida* типов А, В и Д по капсульному антигену, выделенных из патологического материала от свиней различного возраста и молодняка крупного рогатого скота на территории РФ, в перекрестной реакции агглютинации (РА) для выяснения их родства или различия по соматическому антигену с референтными штаммами.

Учитывая, что основная роль в данной патологии животных принадлежит серовариантам А1, А3, А4, В6 и Д3, определение степени антигенного родства проводили относительно штаммов *P. multocida* именно этих серовариантов.

Материалы и методы

В работе использовали следующие референтные штаммы *Pasteurella multocida*, полученные из Американской коллекции типовых культур (АТСС): *P. multocida* А1 № 11039, *P. multocida* А3 № 15742 и референтные штаммы, полученные из коллекции ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»: *P. multocida* А1 № 115; *P. multocida* А3 № 1231; *P. multocida* А4 № ВК-3; *P. multocida* В6 № 656; *P. multocida* Д3 № 9.

8 изолятов бактерий РМ-1...РМ-8 были выделены из патологического материала от свиней и молодняка крупного рогатого скота в лаборатории микробиологии ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных». Выделенные бактерии были идентифицированы по биохимическим свойствам как *Pasteurella multocida* и серотипированы по капсульному антигену.

Бактерии культивировали на твердой питательной среде, приготовленной на основе мясного перевара по Хоттингеру с добавлением 10% экстракта эритроцитов лошади, в термостате при 37° С в течение 18 ч. Морфологию бактерий изучали в фиксированных мазках, окрашенных по Граму.

О-антигены изолятов и штаммов получали по традиционной методике [3]. Сыворотки были изготовлены в лаборатории микробиологии ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по схеме Картера [3].

Серотипирование штаммов по соматическому антигену проводили в реакции аг-

глютинации (РА) в полистироловых планшетах по традиционной методике [3] с гомологичными и гетерологичными гипериммунными сыворотками крови кролика.

Степень антигенного родства изолятов и референтных штаммов *P. multocida* серогрупп А, В и Д определяли по соматическому антигену и рассчитывали по формуле Архетти и Хорсфала [5].

$$r_1 = \frac{\text{титр } S_{\text{станд.}} : \text{АГ}_{\text{испыт.}}}{\text{титр } S_{\text{станд.}} : \text{АГ}_{\text{станд.}}};$$

$$r_2 = \frac{\text{титр } S_{\text{испыт.}} : \text{АГ}_{\text{станд.}}}{\text{титр } S_{\text{испыт.}} : \text{АГ}_{\text{испыт.}}};$$

$$R\% = 100 \sqrt{r_1 r_2}, \text{ где:}$$

титр $S_{\text{станд.}} : \text{АГ}_{\text{испыт.}}$ — средний геометрический титр сыворотки крови кролика, полученный на референтный штамм с антигеном из испытуемого штамма; титр $S_{\text{станд.}} : \text{АГ}_{\text{станд.}}$ — средний геометрический титр сыворотки крови кролика, полученный на референтный штамм с антигеном из референтного штамма; титр $S_{\text{испыт.}} : \text{АГ}_{\text{станд.}}$ — средний геометрический титр сыворотки крови кролика, полученный на испытуемый штамм с антигеном из референтного штамма; титр $S_{\text{испыт.}} : \text{АГ}_{\text{испыт.}}$ — средний геометрический титр сыворотки крови кролика, полученный на испытуемый штамм с антигеном из испытуемого штамма; r_1 и r_2 — коэффициенты одностороннего антигенного родства; $R\%$ — коэффициент двустороннего антигенного родства штаммов.

Для определения степени родства проводили перекрестное титрование сывороток сравниваемых штаммов с гомологичными и испытуемыми антигенами с вычислением одностороннего r_1 . Также имея гипериммунную сыворотку крови кроликов, полученную на испытуемый штамм, определили значение r_2 [4]. При $R \geq 75\%$ штамм относили к одному сероварианту [4].

Результаты исследования

Гипериммунные сыворотки крови кролика и О-антигены были получены на все испытуемые изоляты и референтные штаммы.

Результаты расчета коэффициента двустороннего родства представлены на диаграмме (рис. 1).

Как видно из диаграммы, у изолята «РМ-5» коэффициент двустороннего родства равен 98,5% с референтным штаммом № 11039, что свидетельствует о принадлежности этого изолята к сероварианту А1.

У изолята «РМ-3» коэффициент родства был равен 87,3% с референтным штам-

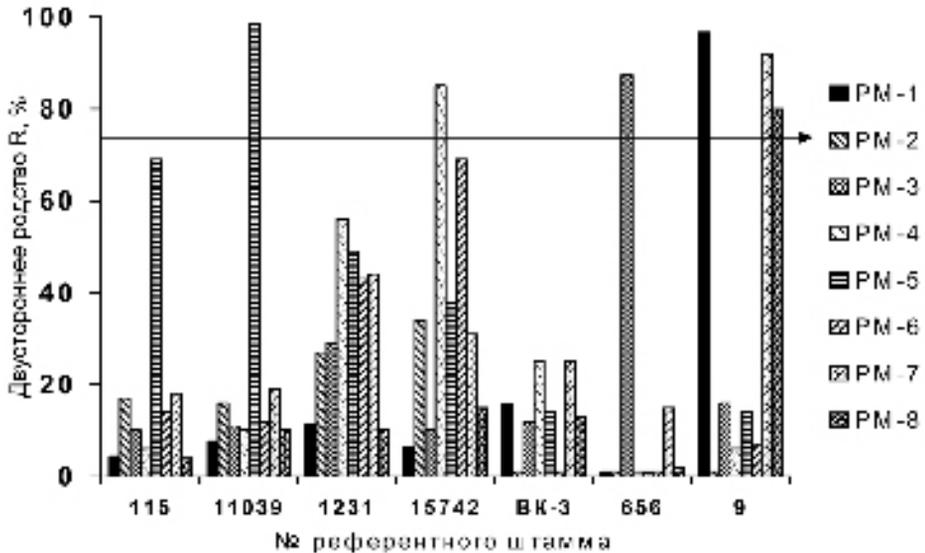


Рисунок 1. Степень антигенного родства (R, %) изолятов и референтных штаммов бактерий *Pasteurella multocida* (n=3)

мом №656, что показывает на принадлежность этого изолята к сероварианту В6.

Коэффициент двустороннего родства изолята «PM-4» с референтным штаммом №15742 составляет 82,5%. Это свидетельствует о принадлежности данного изолята к сероварианту А3.

При расчете коэффициента двустороннего родства изолятов «PM-1», «PM-7» и «PM-8» наивысшее значение (R=96,7%, R=92% и R=80%, соответственно) было отмечено с референтным штаммом №9. Исходя из полученных данных, видно, что эти изоляты принадлежат к сероварианту Д3.

Изоляты «PM-2» и «PM-6», принадлежащие к серогруппе А по капсульному

антигену, не являются родственными по соматическому антигену референтным штаммам, т.к. коэффициенты двустороннего родства не превышают 75%.

Заключение

Исследуемые изоляты *Pasteurella multocida*, выделенные от свиней и молодняка крупного рогатого скота на территории РФ, принадлежали к серогруппам А, В и Д по капсульному антигену. По соматическому антигену 3 из них — «PM-1», «PM-7», «PM-8» были отнесены к сероварианту Д3, «PM-3» — к сероварианту В6, «PM-5» — к сероварианту А1 и «PM-4» — к сероварианту А3. 2 изолята («PM-2» и «PM-6») не были родственны использованным в данной работе референтным штаммам.

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты опытов по определению серовариантной принадлежности изолятов бактерий *Pasteurella multocida* в сравнении с референтными штаммами. Коэффициенты одностороннего и двустороннего родства рассчитывали по формуле Арчетти и Хорсфала. Авторы установили, что 3 исследуемых изолята *P. multocida* по соматическому антигену можно отнести к сероварианту Д3, 1 — к сероварианту В6, 1 — к сероварианту А1, 1 — к сероварианту А3. 2 изолята отличались от референтных штаммов, использованных в данной работе.

ABSTRACT

The *Pasteurella multocida* isolates classification by sero-variants to the reference strains was carried out. The results of the investigation are shown. The unilateral and bilateral relatedness was estimated according to the formula derived by Archetti and Horsfall. Three investigated *P. multocida* isolates were classified as D3 sero-variant according to the somatic antigen, one was determined as sero-variant B6, one was classified as sero-variant A1, one was identified as sero-variant A3. Two isolates were different from the reference strains used.

Литература

- Р.В. Душук, Э.В. Романенко, Е.К. Шапошникова, Л.М. Шапошникова. Антигенная характеристика *Pasteurella multocida* и эпизоотическая значимость сероваров // ЖМЭИ. 1998. № 3. С. 108–112.
- Р.В. Душук. Болезни, вызываемые пастереллами. Пастереллезы // Инфекционные болезни животных: справочник / ред. Д.Ф.Осидзе. М., 1987 С. 188–194.
- Методы общей бактериологии: в 3-х т.-М.: Мир, 1983. Т.1. 536 с.
- Ю.А. Черняев, А.И. Собко. Определение соответствия эпизоотических штаммов вируса ящура производственным // Ветеринария. 1973. № 1. С. 43–46.
- J. Archetti, F.L. Horsfall. Persistent antigenic variation of influenza // J. Exp. Med. 1950. V.92. P.441.