

По рецептору сидерофора совпадения составили 99-100%.

По сиквенс анализу подтверждается наличие гена *BvgR* в геноме *Bordetella bronchiseptica* 4617, *Bordetella parapertussis* ATCC 15311. В качестве референсной последовательности использовался фрагмент гена *BvgR* *Bordetella bronchiseptica* 253.

Заключение. 1. Проведенные исследования свидетельствуют об относительной консервативности изучаемых мишеней, ответственных за вирулентные свойства, что, по-видимому, обусловлено участием данных структур в росте и развитии патогенных бордетелл.

2. Сравнение последовательностей у бактерий рода *Bordetella* позволило выявить сходство и отличие в генах, кодирующих факторы вирулентности, а также был обнаружен оперон рецессии *BvgR* *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Bordetella parapertussis* ATCC 15311, двухкомпонентной системы регуляции уровня экспрессии генов, отвечающих за вирулентность бактерий. Были идентифицированы следующие отличия: в гене *BvgR* найдена замена Т/С (данная мутация не приводит к аминокислотной замене, молчащая мутация).

3. Установлено отсутствие оперона рецессии *BvgR* у штамма *Bordetella bronchiseptica* КМИЭВ В-120, что позволяет сделать заключение о пригодности данного штамма к производству вакцинных препаратов.

4. Ввиду сходства фенотипических признаков (биохимические свойства) изучаемых культур, сделать равнозначное заключение о пригодности культур к вакцинопроизводству, основываясь только на биохимических тестах, не представляется возможным, необходимо проводить более углубленное изучение в ПЦР по предложенной нами схеме.

Литература. 1. Hewlett, EL (1995). "Bordetella species." In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandel, GL, Bennett, JE, Dolin, R, eds.). Churchill Livingstone, Inc., New York, NY, pp. 2078–2084. 2. Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9. 3. Finger H, von Koenig CHW (1996). *Bordetella*. In: *Barron's Medical Microbiology* (Barron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf) ISBN 0-9631172-1-1. 4. Coote JG (2001). "Environmental sensing mechanisms in *Bordetella*". *Adv Microb Physiol* 44: 141–81. doi:10.1016/S0065-2911(01)44013-6. PMID 11407112. 5. Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF (2001). "Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis". *Front Biosci* 6: E168–86. doi:10.2741/Mattoo. PMID 11689354. 6. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR (2005). "Bordetella pertussis, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*". *PLoS Pathog* 1 (4): e45. doi:10.1371/journal.ppat.0010045. PMC 1323478. PMID 16389302. 7. Lawhorn, Bruce. "Atrophic Rhinitis" (PDF). Texas Agricultural Extension Service. Retrieved 2006-11-23. УДК 619:616. 619:579.841.94:579.22

Статья передана в печать 03.06.2014 г.

УДК 619:616. 619:579.841.94:579.22

ПОДБОР ШТАММА *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Вербицкий А.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

*Иммунизация лабораторных животных инактивированным штаммом *Bordetella bronchiseptica* КМИЭВ-120 защищает их от гибели в 100% случаев после контрольного заражения. У вышеуказанного штамма обнаружен нитевидный гемагглютинин *FhaB*, который является основным фактором вирулентности *Bordetella* spp. и установлено отсутствие оперона рецессии *BvgR* обеспечивающего активность белков вирулентности, что подтверждает пригодность к производству биологических препаратов.*

*Immunization of experimental animals with inactivated *Bordetella bronchiseptica* strain KMIEV-120 protects against death in 100% of cases after challenge. In the above strain detected filamentous haemagglutinin *FhaB*, which is a major virulence factor of *Bordetella* spp. and found to lack operon recession *BvgR* providing virulence activity of proteins, which confirms the suitability for production of biologicals.*

Ключевые слова: *Bordetella bronchiseptica*, штамм, атогенность, иммуногенность, генетический анализ.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, strain, pathogenicity, immunogenicity, genetic analysis.

Введение. Доминирующее положение в общей патологии у свиней занимают респираторные болезни. По происхождению и клинико-морфологическому проявлению они весьма разнообразны. Одной из причин инфекционной патологии органов дыхания является *Bordetella bronchiseptica*. Заболевание, вызванное этим видом микроорганизма (бордетеллез, бронхосептикоз, бордетеллезная инфекция), регистрируется в странах с промышленным ведением свиноводства. Ассоциация бордетелл с *Pasteurella multocida* приводит к развитию атрофического ринита у свиней.

Основным звеном в мероприятиях по борьбе с бордетеллезом и атрофическим ринитом является специфическая профилактика. Для создания качественных биологических препаратов важно иметь высокоиммуногенные штаммы бактерий не теряющие вирулентные свойства при пересевах. Исходя из

вышеуказанного, нами определена цель – подбор штамма *Bordetella bronchiseptica* пригодного для конструирования биологических препаратов.

Материалы и методы исследований. Бактериологические исследования патматериала проводили согласно:

- «Методическим указаниям по лабораторной диагностике бордетеллезной инфекции свиней» (Н.Н. Андросик, Г.Е. Толяронок, Л.Д. Андросик, А.А. Вербицкий с соавт., 2001);
- Методическим рекомендациям по проведению микроскопических исследований в ветеринарных диагностических лабораториях. Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/137);
- Методическим рекомендациям по определению ферментативной активности бактерий. Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/130);
- Методическим указаниям по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 17.12.2007 (№ 10-2-5/1112).

Биохимические свойства выделенных штаммов определяли на диагностическом биохимическом анализаторе бактерий Vitek, а также с использованием диагностических систем Lachema.

Чувствительность к антибиотикам определяли на диагностическом приборе Vitek, а также с помощью дисков производства НИЦФ (Санкт-Петербург).

Патогенность выделенных штаммов изучали на белых мышах. Для чего создали для каждого исследуемого штамма по десять групп мышей по четыре головы в каждой. Агаровую культуру исследуемых штаммов смывали 0,85%-ным стерильным изотоническим раствором натрия хлорида. Определяли концентрацию микробных клеток по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича, стерильным изотоническим раствором натрия хлорида доводили содержание микробных клеток до $1 \text{ млрд}/\text{см}^3$ и проводили десятикратные разведения от 1 до 10. Каждым разведением заражали по четыре мышки весом 16-18 г. За мышами вели наблюдение в течение десяти дней.

Математический расчет летальности LD_{50} проводили по Керберу.

После проверки выделенных штаммов бордетелл на биохимические свойства, чувствительность к антибиотикам, патогенность проводили окончательную дифференцировку штаммов в полимеразно-цепной реакции с помощью электрофореза.

Отобранные штаммы были лиофильно высушены и зарегистрированы в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Отобранные штаммы бордетелл испытывали на иммуногенность на белых мышах. Опыт проводился в условиях вивария.

Культуры бордетелл выращивали в матрах с МПА+10% сыворотки крови лошади, на поверхность которых вносили 5-10 мл расплодки, полученной из лиофильно высушенных флаконов, равномерно распределяли покачиванием. Выращивание бактерий проводили в течение 18-24 часов при температуре 37°C .

Выросшие культуры смывали изотоническим раствором натрия хлорида pH 7,2-7,4 и доводили этим же раствором до концентрации 10^8 м.к./мл. После чего делали десятикратные разведения этого смыва до концентрации 10^1 м.к./мл. Каждое разведение культуры нумеровали.

Для проведения опыта по определению LD_{50} для каждого штамма брали 9 групп белых мышей массой 18-20 г по 7 животных в каждой группе. Каждой группе животных внутрибрюшинно вводили соответствующий раствор смыва в объеме 0,5 мл. В течение 10 дней за животными вели наблюдения, регистрируя число погибших и выживших животных в каждой группе. Схема опыта по определению патогенности штаммов приведена в таблице 1.

Таблица 1 - Схема опыта по определению патогенности штаммов

| № группы | № вводимого раствора | Концентрация м.к. в 1 мл | Доза на животное, мл | Концентрация м.к. на жив-е |
|----------|----------------------|--------------------------|----------------------|----------------------------|
| 1 | 1 | 1×10^8 | 0,5 | $0,5 \times 10^8$ |
| 2 | 2 | 1×10^7 | 0,5 | $0,5 \times 10^7$ |
| 3 | 3 | 1×10^6 | 0,5 | $0,5 \times 10^6$ |
| 4 | 4 | 1×10^5 | 0,5 | $0,5 \times 10^5$ |
| 5 | 5 | 1×10^4 | 0,5 | $0,5 \times 10^4$ |
| 6 | 6 | 1×10^3 | 0,5 | $0,5 \times 10^3$ |
| 7 | 7 | 1×10^2 | 0,5 | $0,5 \times 10^2$ |
| 8 | 8 | 1×10^1 | 0,5 | $0,5 \times 10^1$ |
| 9 | Физ.р-р | - | - | - |

После определения LD_{50} каждого штамма проводили испытания по определению иммунной активности штаммов.

При испытании иммунной активности использовали формализированные суточные культуры. Для приготовления смывов культур флаконы с лиофильно высушенными штаммами высевали на МПА и МПБ. Через 18-24 часа расплодку высевали на матры с МПА+10% сыворотки крови лошади. Смыв суточной культуры проводили изотоническим раствором натрия хлорида (pH 7,2-7,4) и доводили этим же раствором до концентрации 10 млрд. м.к. в 1 мл. Инактивацию полученной культуры проводили формалином в конечной концентрации 0,3-0,5%. Для проведения опыта отбирали в стерильный флакон по 15-20 мл формализированного смыва культуры.

Опыт проводился на белых мышах. Для каждого штамма было взято 2 группы мышей (опытная и контрольная) массой 18-20 г по 10 животных в каждой группе. Подготовленную культуру вводили опытной

группе мышей в концентрации 5 млрд. м.к./на животное (0,5 мл). Контрольной группе мышей вводили 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида.

Затем через 14 дней всех опытных и контрольных животных внутрибрюшинно заражали смывом гомологичной агаровой культуры в дозе ЛД₅₀. Наблюдение за животными после их заражения вели в течение 10 дней. Учитывали гибель животных в каждой группе.

Результаты исследований. При исследовании патологического материала от павших животных, подозрительных по заболеванию бордетеллезом и атрофическим ринитом, были выделены два штамма *Bordetella bronchiseptica*.

Выделенные штаммы *Bordetella bronchiseptica* в МПБ в первые сутки давали легкое помутнение среды, при более длительном культивировании (4-5 суток) образовывали пристеночное кольцо, а на дне пробирки - осадок, поднимающийся при энергичном встряхивании в виде "косички".

На МПА через 24 часа отмечали росинчатые полупрозрачные, блестящие колонии величиной с булавочную головку. Через 48-72 часа эти колонии приобретали серо-белый цвет. На казеиново-угольном агаре наблюдали аналогичный рост. На среде Гартоха отмечали беловатые каплевидные колонии, на агаре Мак-Конки – розовые со светлым центром куполообразные колонии. На кровяном агаре зона гемолиза проявлялась через 48 часов, но четкие результаты были выявлены лишь после дополнительного 24 часового выдерживания при комнатной температуре.

В мазках-отпечатках, окрашенных по Граму, выявили грамтрицательные короткие палочковидные бактерии с закругленными концами. В мазках, приготовленных из бульонных и агаровых культур, выделенные штаммы имели вид грамтрицательных палочек с закругленными концами, размером 0,4-0,6x1,5-2,5 мкм, или грамтрицательных коккобактерий, расположенных одиночно или попарно. При изучении биохимических свойств установили, что выделенные культуры бордетелл не расщепляли углеводы и многоатомные спирты не образовывали индол и сероводород, давали положительную реакцию на уреазу, редуцировали нитраты и образовывали аммиак. Таким образом, на основании культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств выделенные культуры отнесены к *Bordetella bronchiseptica*. Эти 2 штамма были лиофильно высушены и зарегистрированы в коллекции микроорганизмов.

Выбор наиболее высокоиммуногенного штамма. На первом этапе опыта были определены ЛД₅₀ для каждого штамма. Данные результаты представлены в таблицах 2-3.

Таблица 2 – Результаты опыта по определению ЛД₅₀ для штамма *Bordetella bronchiseptica* №1

| № группы | Разведения | Доза, мл | Количество животных | Пало, гол | Выжило, гол | LD ₅₀ |
|----------|-------------------|----------|---------------------|-----------|-------------|--------------------|
| 1 | 1x10 ⁸ | 0,5 | 7 | 7 | 0 | 1x10 ⁻⁴ |
| 2 | 1x10 ⁷ | 0,5 | 7 | 7 | 0 | |
| 3 | 1x10 ⁶ | 0,5 | 7 | 7 | 0 | |
| 4 | 1x10 ⁵ | 0,5 | 7 | 5 | 2 | |
| 5 | 1x10 ⁴ | 0,5 | 7 | 3 | 4 | |
| 6 | 1x10 ³ | 0,5 | 7 | 2 | 5 | |
| 7 | 1x10 ² | 0,5 | 7 | 1 | 6 | |
| 8 | 1x10 ¹ | 0,5 | 7 | 0 | 7 | |
| 10 | контроль | 0,5 | 7 | 0 | 7 | |

Таблица 3 – Результаты опыта по определению ЛД₅₀ для штамма *Bordetella bronchiseptica* №2

| № группы | Разведения | Доза, мл | Количество животных | Пало, гол | Выжило, гол | LD ₅₀ |
|----------|-------------------|----------|---------------------|-----------|-------------|----------------------|
| 1 | 1x10 ⁸ | 0,5 | 7 | 7 | 0 | 1x10 ^{-4,5} |
| 2 | 1x10 ⁷ | 0,5 | 7 | 5 | 2 | |
| 3 | 1x10 ⁶ | 0,5 | 7 | 5 | 2 | |
| 4 | 1x10 ⁵ | 0,5 | 7 | 4 | 3 | |
| 5 | 1x10 ⁴ | 0,5 | 7 | 3 | 4 | |
| 6 | 1x10 ³ | 0,5 | 7 | 2 | 5 | |
| 7 | 1x10 ² | 0,5 | 7 | 0 | 7 | |
| 8 | 1x10 ¹ | 0,5 | 7 | 0 | 7 | |
| 10 | контроль | 0,5 | 7 | 0 | 7 | |

После определения ЛД₅₀ каждого штамма проводили определение их иммуногенности. Результаты опыта по определению иммуногенности штаммов приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Определение иммуногенности выделенных штаммов

| Штамм | Группа | Кол-во голов | Выжило, гол. | Пало, гол | % выживших |
|-------------------------------------|-------------|--------------|--------------|-----------|------------|
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> №1 | Опытная | 10 | 10 | 0 | 100 |
| | Контрольная | 10 | 0 | 10 | 0 |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> №2 | Опытная | 10 | 7 | 3 | 70 |
| | Контрольная | 10 | 1 | 9 | 10 |

Приведенная таблица свидетельствует о более высокой иммуногенности штамма №1, который впоследствии паспортизирован, депонирован, лиофилизирован и заложен на хранение. Штамму присвоен номер КМИЭВ-В120. Данный штамм обладает следующими характеристиками. Патогенен для животных. При внутрибрюшинном введении вызывает гибель белых мышей массой 14-16 грамм. В мазках, приготовленных из бульонных и агаровых культур, окрашенных по Граму, имеет вид грамтрицательных бактерий (коккобактерий). На МПБ, бульоне Хоттингера в первый день выращивания дает легкое равномерное помутнение среды, на 2-4 день на дне пробирки образует осадок, поднимающийся при встряхивании пробирки в виде косички с просветлением бульона. На МПА и агаре Хоттингера образует мелкие прозрачные круглые с ровными краями колонии слизистой консистенции диаметром 1,0-1,5 мм. На угольно-казеиновом агаре - круглые серо-белые с ровными краями колонии слизистой консистенции диаметром 0,5-2,0 мм. В биохимическом отношении к сахарам и многоатомным спиртам инертен. В качестве источника питания место сахаров использует цитраты, тиогликоляты, ацетаты, нуждается для роста в глутамине, никотиновой кислоте и дрожжевом экстракте. Реакция на индол и сероводород - отрицательная. МПЖ не разжигает. Уреазаопозитивен. Имеет в своем составе К- и О-антигены. Гемолитические свойства выражены слабо (на кровяном агаре дает непрозрачный α -гемолиз при pH 6,2-6,8). Чувствителен к флумизолу, мономицину, гентамицину, левомицетину, канамицину, тетрациклину.

В дальнейшей работе был проведен генетический анализ изучаемого штамма микроорганизмов (в сравнении со штаммами коллекции ATCC (американская коллекция типовых культур), в отношении наличия или отсутствия генов, кодирующих факторы вирулентности. При постановке ПЦР с праймерами rRNA1 (f/r) и 16S rRNA2 (f/r), было установлено, что все исследуемые штаммы формируют в электрофорезном геле светящуюся полосу, соответственно имеют специфический ген, кодирующий 16S субъединицу РНК. У штамма *Bordetella bronchiseptica* КМИЭВ В-120 обнаружено отсутствие гена (*BvgR*), отвечающего за функцию рецессии (снижения активности белков вирулентности), в то время у всех штаммов, полученных из коллекции ATCC, было выявлено наличие вышеуказанного гена. Помимо этого у отобранного нами штамма был обнаружен нитевидный гемагглютинин *FhaB*, который является основным фактором вирулентности *Bordetella* spp., а также основным компонентом бактериальных бесклеточных вакцин.

Заключение. 1. При исследовании патологического материала было выделено два штамма *Bordetella bronchiseptica*, идентифицированных на биохимическом анализаторе бактерий Vitek 2, в стриповых системах Lachema. 2. Выделенные штаммы являются патогенными для белых мышей. LD₅₀ штаммов составляет от 10^{-4,0} до 10^{-4,5}. 3. Для конструирования вакцины был отобран штамм зарегистрированный как *Bordetella bronchiseptica* («КМИЭВ-В120»), иммунизация им защищает лабораторных животных от гибели в 100% случаев после контрольного заражения, у которого установлено отсутствие оперона рецессии *BvgR*, что является подтверждением пригодности данного штамма к производству биологических препаратов.

Литература. 1. Ашмарин, И.П. *Статистические методы в микробиологических исследованиях* / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев // М.: Медгиз, 1962. - 125 с. 2. Медведев, А.П. *Основы получения противобактериальных вакцин и сывороток* / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий. - Витебск: ВГАВМ, 2010.-200с. 3. Пейсак, З. *Болезни свиней* / Зигмунт Пейсак; пер. с польского Д.В. Потапчука. - Брест: ОАО «Брестская типография», 2008. - 424с. 4. *Справочник по бактериологическим методам исследований в ветеринарии*. Сост. А.Э. Высоцкий, З.Н. Барановская. - Минск: Белтаможсервис, 2008. - 824с. 5. Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF (2001). "Mechanisms of *Bordetella pathogenesis*". *Front Biosci* 6: E168-86. doi:10.2741/Mattoo. PMID 11689354.

Статья передана в печать 03.06.2014 г.

УДК 619:616.476-097.3:615.371:636.5

ВЛИЯНИЕ «МИТОФЕНА» НА МАКРОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОРГАНОВ ИММУНИТЕТА ЦЫПЛЯТ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ

*Кадхум Ф.С., *Громов И.Н., *Масейкова Я.С., **Святковский А.В., **Слободянюк А.А.,
**Святковский А.А.

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

** ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства
Россельхозакадемии», г. Ломоносов

В статье рассматривается влияние антиоксидантного препарата «Митофена» на макроморфометрические показатели органов иммунитета цыплят, вакцинированных против инфекционной бурсальной болезни (ИББ). Установлено, что иммунизация птиц против ИББ совместно с «Митофеном» и без него вызывает увеличение абсолютной массы тимуса и фабрициевой бурсы, что указывает на активизацию лимфопролиферативных процессов. В то же время введение вакцины совместно с «Митофеном» приводит к достоверному увеличению абсолютной массы и индекса селезенки, по сравнению с использованием вакцины без иммуностимулятора.

The influence of antioxidant mytophen on the macromorphometrical parameters of chickens, vaccinated against infectious bursal disease have been observed. In proved that immunization of birds against IBD together with mytophen and without him causes increase in absolute weight of thymus and bursa of Fabricius, that specifies activation lymphoproliferative processes. At the same time vaccine introduction together with the