**Разработка комплексного подхода к методам типирования серовариантов и детектирования токсигенных вариантов Рasteurella multocida биохимическим, биологическим методом и методом ПЦР**

|  |  |
| --- | --- |
| **Тема** | Разработка комплексного подхода к методам типирования серовариантов и детектирования токсигенных вариантов Рasteurella multocida биохимическим, биологическим методом и методом ПЦР |
| **Период выполнения** | 2020-2022 гг. |
| **Актуальность** | Пастереллезы, - высококонтагиозные инфекционные заболевания сельскохозяйственных и диких животных, пушных зверей и птиц с высокой летальностью и тенденцией к стационарности. Впервые Pasteurella multocida была показана как возбудитель холеры домашней птицы Луи Пастером в 1881 году.  Пастереллезы регистрируются во всех странах мира с развитым животноводством, свиноводством, птицеводством и кролиководством, в том числе и в РФ и остаются актуальной проблемой как для ветеринарии, так и для медицины. По данным Департамента ветеринарии МСХ РФ в Российской Федерации ежегодно регистрируется от 20 до 40 неблагополучных по пастереллезу пунктов.  Заболевание характеризуется при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением и отёком лёгких, плевритом, а при хроническом течении – гнойно-некротической пневмонией, артритом, маститом, керато-конъюнктивитом, эндометритом и иногда энтеритом.  В настоящее время общепризнанно, что помимо геморрагической септицемии P. multocida вызывает и другие формы пастереллеза с клиникой пневмонии, мастита, атрофического ринита, тонзиллита, менингита, энцефалита, абортов и абсцессов у разнообразных домашних и диких животных во многих странах мира.  По данным Департамента ветеринарии МСХ РФ в Российской федерации ежегодно регистрируется от 20 до 40 неблагополучных по пастереллезу животноводческих, свиноводческих, птицеводческих пунктов  Пастереллезы животных способны вызывать представители нескольких серогрупп пастерелл. Большинство из них вызывают у животных хроническое носительство. Пастереллез наносит значительный экономический ущерб, складывающийся из высокой летальности животных, затрат на лечение, и других ветеринарно-санитарных мероприятий по ликвидации и профилактике заболевания. Кроме того, переболевшие животные длительное время остаются носителями пастерелл и служат источником возбудителя инфекции для здоровых животных.  Многими авторами подчёркивается сложность антигенного состава Pasteurella multocida с различной степенью активности отдельных антигенных компонентов.  Бактерии рода Pasteurella, семейства Pasteurellaceaeнеоднородны в антигенном отношении и подразделяются на 5 капсульных групп (А, В, D, E, F)*.* Heddleston K.L. в реакции диффузной преципитации (РДП) обнаружил наличие шестнадцати липополисахаридных соматических типов (протеин наружной мембраны OmpH) этой бактерии, которые обозначают цифрами. На основании полученных данных авторы предлагают характеризовать штаммы P.multocida по капсульному и соматическому антигенам и в связи с этим именовать их 1:А, 3:А, 2:В и т.д. Штаммы 1:А и 3:А имеют общий капсульный антиген А, но различные соматические антигены.  Штаммы пастерелл могут иметь общий капсульный антиген, но различные соматические антигены Геморрагическую септицемию крупного рогатого скота включённую в список МЭБ, вызывают серотипы Pasteurella multocida, обозначенные 6:В и 6:Е..Основным возбудителем геморрагической септицемии у буйволов в Азии, является P. multocida серотип B:2, ответственный за развитие острого эндотоксического шока.  К факторам вирулентности пастерелл также относятся капсульный полисахарид, протеин наружной мембраны (OmpH), экзо- и эндотоксины, в том числе дермонекротический токсин (tox А), играющий основную этиологическую роль в развитии атрофического ринита у свиней.  У пастерелл отмечается определённая зависимость между вирулентностью, капсулооброзованием и токсинообразованием (липополисахаридный эндотоксин и дермонекротизирующий toxA токсин).  Результаты исследования серологической гетерогенности пастерелл коренным образом изменили представления о пастереллезах сельскохозяйственных животных. Комбинация факторов вирулентности у штаммов и изолятов бактерии Pasteurella multocida различных серогрупп и серотипов может быть разной, и является важным маркером для определения их роли в развитии болезни, клиническом проявлении, поражении животных различных возрастных категорий. С другой стороны, как антигенные детерминанты, они стимулируют развитие адаптивного иммунного ответа.  Основной мерой профилактики пастереллезов является вакцинация, эффективность которой зависит от полноты и специфичности антигенных детерминант, опосредующих иммунный ответ против эпизоотических штаммов, циркулирующих в хозяйствах.  Одним из важнейших протективных антигенов бактерии и перспективным кандидатом при разработке вакцин против пастереллеза крупного рогатого скота вместе с капсульным полисахаридом является протеин наружной мембраны (OmpH) клеточной стенки. У данного протеина выявлены 2 антигенные детерминанты, аминокислотные последовательности которых различаются у разных серогрупп бактерии. По биологическим свойствам (OmpH)- антигены токсичны, активны в серологических реакциях; введение их вызывает образование специфического иммунитета. Протеин OmpH является протективным антигеном бактерии и хорошо изучен у штаммов, изолированных от птиц. Но при этом отсутствуют сведения о частоте выявления этих генов у изолятов, выделенных от телят с респираторной патологией.  В настоящее время для борьбы с пастереллезом в нашей стране используют противопастереллезные вакцины и гипериммунную специфическую сыворотку, профилактирующие появление острого (септического) пастереллеза и недостаточно эффективно предохраняющие от возникновения пневмоний пастереллезной этиологии.  Несмотря на востребованность и расширение ассортимента вакцинных препаратов, перечень вакцинных штаммов, используемых 5 отечественными биопредприятиями для выпуска вакцин против пастереллеза животных и птицы на протяжении 30 лет не менялся и ограничен использованием комбинации незначительного числа штаммов серогруппы А, В и D без определения их серотиповой принадлежности по соматическому антигену и потенциальной способности к токсинообразованию растворимых соматических токсинов и дермонекротического токсина.  В начале восьмидесятых годов за рубежом появился ряд публикаций, посвящённых изучению биологических и физико-химических свойств токсина P.multocida серологического варианта Д, однако к настоящего времени этот токсин изучен крайне недостаточно. В нашей стране исследования в данном направлении не проводились.  Анализ литературных данных показал отсутствие целостного подхода к методам типирования Рasteurella multocida и детектирования токсигенных вариантов.  Среди рутинных методов типирования P.multocida по капсульному антигену до настоящего времени используется тест на выявление гиалуроновой кислоты в капсуле бактерий, и акрифлавиновая проба (МУК МСХ РФ № 22-7/82 от 20.08.1992 г). К недостаткам данного способа относится низкая специфичность, невозможность типирования серогрупп E и F и вероятность возникновения спонтанных мутаций, приводящих к появлению безкапсульных вариантов бактерии, что приводит к невозможности их типирования по данному способу.  Типирование пастерелл по серотипам (OmpH) в нашей стране не проводится ввиду отсутствия специфических сывороток. Попытки в конце 90-х годов коллектива учёных под руководством Душука Р.В. получить типоспецифические гипериммунные сыворотки успехом не увенчались. За рубежом для типирования пастерелл по серотипам используют реакцию гемагглютинации, однако коммерческие сертифицированные типовые сыворотки в свободном доступе отсутствуют.  Исследования, проведённые в разных странах, показывают широкую распространённость tox А -продуцирующих вариантов P. multocida серогрупп А и Д, выделенных от кроликов, крупного рогатого скота, кошек, собак и индеек (3, 10, 16). [Ewers C](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ewers%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16427218). Et al. , сообщают, что ген, кодирующий дермонекротоксин, присутствует у 12,5% изолятов пастерелл, выделенных от свиней, мелких жвачных животных, крупного рогатого скота и птицы. При этом установлена значимая связь со статусом заболевания у свиней. Предполагается, что гены toxA, являются важными эпидемиологическими маркерными генами для характеристики полевых штаммов P. multocida.  В работе Шубиной Е.А. показано, что бактерии P. multocida продуцирующие дермонекротизирующий токсин (toxA), играют важную роль в патогенезе заболевания свиней атрофическим ринитом.  Однако до настоящего времени в нашей стране исследования в данном направлении не проводились и, соответственно, сведений о типировании штаммов пастерелл по продукции дермонекротического токсина при конструировании отечественных вакцин в доступной литературе не обнаружено.  Методика получения дермонекротического токсина пастерелл который, является одним из основных этиологических факторов атрофического ринита свиней, не введена в научный обиход.  При этом контроль качества отечественных вакцин базируется на определении иммуногенной активности капсульного антигена методом прямого заражения вакцинированных животных.  Отсутствие доказательств серотиповой и токсигенной (toxA) активности штаммов пастерелл в составе отечественных вакцин является препятствием для усовершенствования методов контроля качества и разработки новых вакцин с учетом эпизоотически значимых вариантов.  Токсигенные от нетоксигенных изоляты *P. multocida* не могут быть дифференцированы морфологией или стандартными биохимическими реакциями в связи с чем до настоящего времени традиционно используют биопробу на патогенность и вирулентность на белых мышах.  В связи с вышеизложенным, исследования по типированию вакцинных и музейных штаммов пастерелл по капсульным антигенам, соматическим (О-) антигенам, продукции дермонекротизирующего токсина (toxA), детерминирующих антигенную активность, являются весьма актуальными и представляют несомненный интерес для практики в области стандартизации лекарственных средств.  Использование молекулярно-генетических методов является более простым, быстрым и точным способом типирования *P. multocida.* Анализ литературы показал принципиальную возможность типирования пяти серогрупп *P. multocida* - A, B, D, E, и F и дермонекротизирующего токсина молекулярно-генетическими методами. В 1994 г Nagai S, Someno S, Yagihashi T. разработали ПЦР анализ для дифференцирования вирулентных штаммов Pasteurella multocida subsp. multocida от авирулентных штаммов на основе toxA гена.  Был амплифицирован toxA ген, кодирующий 143-kDa дермонекротического токсина, который, как полагают, является центральным этиологическим фактором прогрессирующего атрофического ринита свиней. Полученные результаты ПЦР 187 областей ДНК изолятов P. multocida, были совместимы с результатами тестов на коже морских свинок и анализа иммуноблотинга.  Разработкой ПЦР для выявления *P. multocida* в биологическом материале или для типирования чистых и смешанных культур занимались Lichtensteiger CA, et al. Nagai S.H., и другие. В нашей стране разработке ПЦР для выявления *P. multocida* и *M. haemolytica* посвящена работа Терентьевой Т.А. и А.В. Нефедченко А.В. и др.,  Таким образом, возникла необходимость сравнения специфичности биохимических, биологических и молекулярно-генетических методов типирования капсулярных типов серовариантов пастерелл и детектирования токсигенных вариантов *P. multocida* на примере вакцинных, музейных штаммов и полевых изолятов пастерелл  Это позволит учитывать антигенную разнородность при определении способности коммерческих вакцин защищать животных от пастереллеза различных сергрупп и сероваров, выявлять серовары, против которых вакцины не эффективны; определять потенциальную опасность таких сероваров для животных. |
| **Цель исследования** | Целью исследований II этапа НИР является: разработка молекулярно-генетического метода типирования штаммов пастерелл по серогруппам и серотипам и детектирования токсигенных вариантов |
| **Планируемые результаты** | 1. Будет проведено фенотипическое, биохимическое, биологическое типирование вакцинных, музейных и эпизоотических штаммов пастерелл, выделены токсигенные варианты по продукции дермонекротического токсина.  2. В ходе работы будут собраны и обработаны литературные данные по тематике НИР, а также проведена проверка пригодности биохимического метода типирования штаммов пастерелл, пригодность методики контроля штаммов пастерелл на токсинообразование, изучены нуклеотидные последовательности генов мишеней по публичным базам данных (GenBank), проведен выбор праймеров, и зондов, позволяющих амплифицировать фрагменты генома P. multocida, синтез ПЦР праймеров, зондов, подбор условий реакции амплификации, проведена проверка пригодности молекулярно-генетических методов исследования для решения поставленной задачи.  3. Будет проведено молекулярно-генетическое типирование коллекционных  и вакцинных штаммов пастерелл. |