

ГЕММОРАГИЧЕСКАЯ СЕПТИЦИМИЯ

РЕЗЮМЕ

*Геморрагическая септицемия (ГС) является основным заболеванием крупного рогатого скота и буйволов, характеризуется острой септициемией с высокой заболеваемостью и смертностью. Заболевание вызывается некоторыми серотипами *Pasteurella multocida*, которые ограничены географическими районами Азии, Африки, Ближнего Востока и Южной Европы.*

*Диагностика ГС зависит от выделения организма-возбудителя, *P. multocida*, как правило, из крови или костного мозга мертвого животного с помощью культурных и биологических методов и идентификации организма-возбудителя с помощью биохимических, серологических и молекулярных методов.*

Выделение и идентификация возбудителя: Чистые культуры *P. multocida* могут быть получены путем разложения материалов на искусственные среды и последующей идентификации на основе морфологических, культурных и биохимических характеристик *P. multocida*.

Обычно идентификация конкретного серотипа осуществляется с использованием одного или нескольких серологических методов. К ним относятся скользящая агглютинация, косвенная гемагглютинация для «капсульной» типизации с использованием красных кровяных клеток овец, покрытых бактериальными экстрактами, «соматическая» типизация с помощью иммунодиффузионных тестов агарового геля с использованием термообработанных клеточных экстрактов или агглютинация с использованием обработанных кислотой клеток. Подтверждение изолятов может быть выполнено с использованием молекулярных методов.

Серология: Серологические тесты для выявления специфических антител обычно не используются для диагностических целей.

Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам: Эффективными вакцинами против геморрагической септицемии являются bacterины, убитые формалином, или плотные бактерии с адъювантами. Последние повышают уровень и продлевают продолжительность иммунитета.

Семенные культуры для производства вакцин должны содержать капсулированные организмы. Вакцины стандартизированы относительно их бактериальной плотности на основе тестов мутности и сухого бактериального веса. Испытания на эффективность проводятся на мышах и / или кроликах.

А. ВВЕДЕНИЕ

Геморрагическая септицемия (ГС) является основным заболеванием крупного рогатого скота

и буйволов и приводит катастрофическим эпизоотиям во многих азиатских и африканских странах, что характеризуется высокой смертностью и заболеваемостью (Bain et al., 1982; Carter & De Alwis, 1989; De Alwis, 1992; Mustafa и др., 1978; Singh et al., 1996). Болезнь зарегистрирована у диких млекопитающих в нескольких азиатских и европейских странах (Carigan et al., 1991; Rosen, 1981). Во многих азиатских странах вспышки заболеваний чаще всего происходят в климатических условиях, характерных для муссонов (высокая влажность и высокие температуры). Заболевание вызвано *Pasteurella multocida*, грамотрицательным коккобактериалом, главным образом, представленным в виде комменсальных бактерий в носоглотке животных. В основном вызывают заболевание азиатский серотип В: 2 и африканский серотип Е: 2 (система Картера и Хеддлстона), соответствующие 6: В и 6: Е (система Namioka-carter). У диких жвачных животных преобладает серотип В: 2,5, тогда как серотип В: 3,4 также встречается у палевого оленя (Aalbæk et al, 2009). Была зарегистрирована ассоциация других серотипов, а именно А: 1, А: 3 с HS-подобным состоянием у крупного рогатого скота и буйволов в Индии (Kumar et al., 1996). Географическое распределение ГС включает в себя некоторые районы Азии, Африки, Ближнего Востока и Южной Европы. Вспышки заболевания никогда не регистрировались в Мексике, Центральной или Южной Америке.

Клинически, ГС, вызванная штаммами В: 2 или Е: 2, характеризуется лихорадкой, респираторным дистрессом с выделениями из носа и вспениванием из ротовой полости, что в конечном итоге приводит к невозможности передвижения и смерти. Инфекция серотипами А: 1 и А: 3 преимущественно связана с пневмонией и смертью. Септицемия является основной особенностью всех форм заболевания. Инкубационный период варьируется от 3 до 5 дней. В перкументарных случаях может наблюдаться внезапная смерть без клинических признаков (Carter & De Alwis, 1989; De Alwis, 1992). Водные буйволы, как правило, более восприимчивы к ГС, чем крупный рогатый скот, и переносят более тяжелые формы заболевания со значительными клиническими признаками. Выраженный подкожный отек нижней челюсти, шеи и грудной части является отличительным признаком заболевания. В эндемичных районах смертность в основном ограничивается более старыми животными и молодыми взрослыми особями.

При вскрытии большинство животных, подверженных ГС, обычно имеют выраженную отечность шеи, вызванную сильным притоком крови. Также имеются многочисленные петехиальные кровоизлияния во многих тканях и органах, особенно в серозных мембранах. В грудных, перикардиальных и брюшных полостях может содержаться серососудистая жидкость. Легкие в значительной степени перегружены и отечны, а пена обычно присутствует в носовой полости, трахее и бронхах. Микроскопическое исследование показывает наличие интерстициальной пневмонии и отека легких, а также фокальных инфильтратов нейтрофилов и макрофагов во многих тканях. Все эти поражения аналогичны тем, которые наблюдаются при тяжелом сепсисе и септическом шоке.

Массивные эпизоотии могут возникать как в эндемичных, так и в неэндемичных областях (Carter & De Alwis, 1989; De Alwis, 1992). ГС была определена как вторичное осложнение у водных буйволов и крупного рогатого скота после вспышек ящура. Смертность по болезни приближается к 100%, если лечение не проведено на начальном этапе заражения (Carter & De Alwis, 1989; De Alwis, 1992).

Диагноз заболевания основан на клинических признаках, валовых поражениях, заболеваемости и смертности. Для подтверждения требуется изоляция и характеристика

патогена с использованием обычных и молекулярных методов. Нет подтвержденных сообщений об инфицировании человека *P. multocida* В2 и Е2; однако другие серотипы действительно вызывают инфекции в организме человека, и следует принять меры предосторожности, чтобы избежать воздействия. Организм должен быть обработан в лабораториях по биобезопасности 2-го уровня.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Изоляция и идентификация возбудителя

1.1. Культуральные и биохимические методы

Подлинная септицемия при ГС происходит на конечной стадии заболевания, поэтому образцы крови должны быть взяты у больных животных непосредственно перед смертью. Животные на ранних стадиях заболевания не могут содержать *P. multocida* в крови. Бактерии также не всегда присутствуют в носовых выделениях или внутренних жидкостях больных животных.

Образец крови или мазок, взятые из сердца, являются удовлетворительными только в том случае, если они берутся сразу же после смерти. Если смерть животного наступила давно, костный мозг из длинной кости можно использовать для бактериальной изоляции. Если нет возможности для посмертного обследования, кровь может быть собрана из яремной вены путем разреза или аспирации. Образцы крови, отправляемые стандартным транспортным средством, должны быть помещены на лед и хорошо упакованы во избежание утечки. Если образцы крови не будут доставлены в лабораторию в течение нескольких часов, они могут быть заморожены. Однако повторное замораживание и разморозка могут разрушить организмы и не являются рекомендуемыми.

Мазки крови пораженных животных окрашиваются по Граму, Лейшману или метиленовым синим. Организмы выглядят как грамотрицательные, биполярные окрашенные короткие бациллы. Окончательный диагноз не может быть основан на результате прямых микроскопических исследований.

Культуральные образцы или мазки, элюированные в 2-3 мл стерильного физиологического раствора, культивируют. Альтернативно, поверхность длинной кости дезинфицируется спиртом и расщепляется. Костный мозг извлекается асептически и культивируется. Прямая культура обычно удовлетворительна только в том случае, если материал является свежим и свободным от загрязнений или посмертных инвазий, которые в противном случае могут погубить любую присутствующую *Pasteurella*.

Для биологических исследований небольшой объем (0,2 мл) элюированных мазков крови или часть костного мозга в физиологическом растворе инокулируют мышам подкожно или внутримышечно. Мышь обычно служит биологическим «экраном» для посторонних организмов. Если присутствует жизнеспособная *P. multocida*, мыши умирают через 24-36 часов после инокуляции, а чистый рост *P. multocida* можно увидеть в мазках крови. Чистые культуры *P. multocida* обычно можно выращивать из крови мышей, даже когда исходные образцы поступают из относительно старых туш. Организм может быть идентифицирован по его морфологическим и культурным

особенностям, биохимическим реакциям и серологическим исследованиям.

Подходящей бактериологической средой для *Pasteurella* является агар казеин / сахароза / дрожжи (CSY), среда должна содержать 5% крови. Состав этой среды представляет собой гидролизат казеина (3 г), сахарозу (3 г), дрожжевой экстракт (5 г), хлорид натрия (5 г), безводный дикалий-водородный ортофосфат (3 г) и дистиллированную воду до 1 л. РН доводят до 7,3-7,4, после чего добавляют 1,5% агара. Среду автоклавируют при давлении 1 бар в течение 15 минут. После охлаждения до 45-50 ° С добавляют 5% телячьей крови (без антител *P. multocida*) (Wijewardana et al., 1986). Можно также использовать обычный агар с кровью.

Свежеизолированная *P. multocida* образует гладкие, сероватые блестящие полупрозрачные колонии диаметром примерно 1 мм на кровяном агаре после 24-часовой инкубации при 37 ° С. Колонии, выращенные на агаре CSY, по размеру больше. Старые культуры, особенно те, которые выращиваются на средах без крови, могут производить меньшие колонии. *Pasteurella multocida* не растет на агаре MacConkey. Окрашенные по Граму кровяные или тканевые мазки показывают грамтрицательные, короткие, яйцевидные, биполярные окрашенные коккобациллы. Будет видна степень плеоморфизма, особенно в старых культурах, с более длинными стержнями разной длины. Биполярное окрашивание будет более очевидным с использованием метиленового синего или окраски по Лейшману.

Организмы ГС продуцируют оксидазу, каталазу и индол и уменьшают содержание нитратов. Они не производят сероводород или уреазу и не используют цитрат или сжиженный желатин. Глюкоза и сахароза всегда ферментируются только с образованием кислоты. Большинство штаммов также ферментируют сорбитол. Некоторые штаммы ферментируют арабинозу, ксилозу и мальтозу, тогда как салицин и лактоза почти неизменно не ферментируются.

Одним из свойств штаммов *P. multocida*, вызывающих ГС, является способность продуцировать фермент гиалуронидазу (Carter & Chengappa, 1980). Определив род и вид по культурным характеристикам и биохимическим испытаниям, производство гиалуронидазы затем может быть использовано в качестве специфического теста для пастерелл, вызывающих ГС. Следует отметить, что серотипы В, отличные от В: 2 (или 6: В), и тип Е, являются гиалуронидазно отрицательными.

Культуру, продуцирующую гиалуроновую кислоту, просеивают через центр пластины декстрозно-крахмального агара. Культура *Pasteurella*, подлежащая испытанию на производство гиалуронидазы, пронизывается под прямым углом. Пластины инкубируют при 37°С в течение 18 часов. Первоначально использовали *Streptococcus equi*, продуцирующую гиалуроновую кислоту, но удобной культурой для этой цели является капсулированная мукоидная культура *P. multocida* типа А. В точке пересечения слизистый рост производителя гиалуроновой кислоты будет уменьшаться до тонкой линии роста, что указывает на получение гиалуронидазы тестируемой культурой. Использование свежеприготовленных пластин и увлажненного инкубатора будет способствовать производству гиалуроновой кислоты и, таким образом, интерпретации теста.

1.2. Методы серотипирования

Для идентификации серотипов *P. multocida*, вызывающих ГС, используется несколько серотипических тестов. Это тест агглютинации с быстрым скольжением (Namioka & Murata, 1961a), тест косвенной гемагглютинации (ИГА) для капсульной типизации (Carter, 1955), тест агглютинации с использованием обработанных соляной кислотой клеток для соматической типизации (Namioka & Murata, 1961b), тест иммунодиффузии агарового геля (AGON) (Anon, 1981; Heddleston et al., 1972; Wijewardana et al., 1982) и иммуноэлектрофорез (СІЕР) (Carter & Chengappa, 1981).

Гипериммунная антисыворотка для большинства из этих тестов готовится для конкретных контрольных штаммов у кроликов. Культуры в смеси CSY (6-8 часов) высевают на среду агара с кровью CSY. После инкубации в течение ночи (18-20 часов) культуру промывают физиологическим раствором, содержащим 0,3% формалина. Мутность клеточной суспензии регулируется по типу трубки Макфарланда № 4. Кроликам вводят внутривенно с интервалами, равными 3-4 дням, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 и, наконец, 2,0 мл данной суспензии. Кроликам вводят 0,5 мл подобной, но живой, суспензии подкожно или внутримышечно через 1 неделю после последней инъекции. Кровь животных собирают через 10 дней. Сыворотку хранят при -20 ° С; небольшие количества для регулярного использования хранят при 4 ° С с добавлением 1/10000 мертиолатата.

1.2.1. Тест на быструю слайд-агглютинацию (капсульная типизация)

Одну колонию смешивают с каплей физиологического раствора на слайде, добавляют каплю антисыворотки, и постепенно нагревают слайд. Грубая, флоккулярная агглютинация появляется в течение 30 секунд. Старые культуры могут давать мелкую зернистую агглютинацию, образование которой занимает больше времени.

1.2.2. Непрямой тест на гемагглютинацию (капсульная типизация)

Данное исследование было первоначально выполнено с использованием антиген-сенсibilизированных эритроцитов человека (Carter, 1955), но в последнее время использовались овечьи эритроциты (Sawada et al., 1985; Wijewardana et al., 1986). Антиген получают следующим образом:

6-8-часовую культуру из выбранного штамма высевают на чашки с агаром с кровью CSY и инкубируют в течение ночи при 37 ° С. Культуру собирают в 3 мл физиологического раствора, содержащего 0,3% формалина. Затем эту суспензию нагревают при 56 ° С в течение 30 мин, центрифугируют при 3000 г в течение 15 минут при 4 ° С, и прозрачную жидкость для наддува хранят при -20 ° С. Если холодильная центрифуга недоступна, при центрифугировании при 1500 г в течение 30 минут получают супернатантную жидкость. Полученное используется как экстракт антигена. Аналогичную процедуру применяют для получения экстракта антигена из неизвестного штамма, подлежащего типизации.

Овечью кровь собирают асептически в антикоагулянт и центрифугируют при 500 г в течение 10 минут. Упакованные эритроциты промывают три раза в стерильном физиологическом растворе. Экстракт антигена из неизвестного штамма, полученного описанным выше способом, используют для

сенсibilизации эритроцитов или абсорбции на эритроцитах. Это делается путем добавления 15 объемов экстракта антигена к эритроцитам и инкубации смеси в течение 1 часа при 37 ° С с частым встряхиванием. Сенсibilизированные эритроциты извлекают центрифугированием, промывают в стерильном физиологическом растворе три раза и доводят до конечной 1% суспензии в физиологическом растворе. Гипериммунная антисыворотка типа (три объема) поглощается добавлением упакованных эритроцитов (один объем) в течение 30 минут при комнатной температуре и затем центрифугируется при 500 г в течение 10 минут для осаждения эритроцитов. Затем абсорбированную антисыворотку деактивируют нагреванием при 56 ° С в течение 30 минут.

Тест может быть проведен в трубах или пластинах и выполнен в два ряда. Нижеописанное испытание предназначено для стандартных микротитровальных пластин.

- i) Капсульный экстракт неизвестного штамма готовят, как описано выше, и используют для сенсibilизации овечьих эритроцитов. Известные типы гипериммунных сывороток, выращенных у кроликов для типов А, В, D и Е, разводят следующим образом:
- ii) Используя четыре отдельных ряда лунок, первые лунки заполняют 0,72 мл физиологического раствора, следующие шесть лунок или более заполняются 0,4 мл каждая.

Гипериммунные сыворотки, специфичные по типу, отдельно разводят в каждом ряду путем добавления 0,08 мл сыворотки к первой лунке и смешивания с помощью пипетки. Из этой лунки 0,4 мл переносят в следующую лунку, перемешивают, и процесс продолжают до седьмой лунки. Концентрация в первой лунке составляет 1/10 разведения, двойную концентрацию образуется при каждом последующем разбавлении.

- iii) Все лунки заполняют 0,4 мл антиген-адсорбированных / сенсibilизированных эритроцитов, слегка встряхивают и оставляют при комнатной температуре. При добавлении сенсibilизированной крови концентрации сыворотки в лунках удваиваются, то есть 1/20 в лунке, 1/40 во втором и т. д. Каждый тест включает в себя положительный, отрицательный и солевой контроль.
- iv) Первая проба берется через 2 часа, и окончательная проба через 18 часов. Курсовая агглютинация эритроцитов по бокам вогнутых лунок берется как положительное показание, а формирование кнопки в центре лунок как отрицательное. Произвольный балл 1-4 присваивается в зависимости от размера агглютинации. Неизвестный штамм идентифицируется с помощью гипериммунной сыворотки, которая имеет агглютинацию. В отсутствие агглютинации во всех сыворотках, штамм считается неприемлемым.

В то время как НГА можно использовать для ввода неизвестных штаммов, сам тест более эффективен при работе с серотипами В и Е и является более надежным в качестве количественного теста для этих штаммов.

1.2.3. Тесты на иммунодиффузию в агаровом геле

Тесты ИДАГ используются для так называемой «капсулярной», а также «соматической» типизации, в зависимости от используемых антигенов и антисывороток. Используется метод двойной диффузии. Округлые лунки пробивают в твердом агаре таким образом, чтобы одна лунка в центре была окружена шестью периферийными лунками.

- i) *Капсулярная типизация*: гелевая среда представляет собой 1,0% благородный агар или эквивалентный продукт в 0,2 М фосфатном буфере, содержащем мертиолат в конечной концентрации 1/10 000 (Anon, 1981; Wijewardena et al., 1982). Антигены и антисыворотки такие же, как для капсулярной типизации методом ИГА (Carter, 1955). Стандартную антисыворотку помещают в центральную лунку, а тестируемые антигены помещают в периферические лунки попеременно со стандартным гомологичным антигеном.
- ii) *Соматическая типизация*: гелевая среда состоит из специального благородного агара или эквивалентного продукта с концентрацией 0,9% в 0,85% растворе хлорида натрия.
- iii) Для получения антигена культуру с каждой пластины собирают в 1 мл 8,5% хлорида натрия, содержащий 0,3% формалина. Суспензию нагревают при 100°C в течение 1 часа, клетки осаждают центрифугированием, а надосадочную жидкость используют в качестве антигена.
- iv) Антисыворотки для 16 соматических типов (Heddleston et al., 1972) готовятся у цыплят. Маслоэмульгированный бактерин¹ (1 мл) вводится подкожно в среднюю часть шеи 12-16-недельных птиц мужского пола. Дальнейшую инъекцию проводят через 3 недели по 1 мл внутримышечно в грудную клетку, по 0,5 мл на каждой стороне грудины. Кровь птиц собирают 1 неделю, и сыворотку отделяют и сохраняют с 0,01% тиомерсала и 0,06% фенола. Сыворотка тестируется на все соматические типы и сыворотки; типы, которые перекрестно реагируют, отсеиваются. Некоторые антисывороточные препараты для В: 2 могут вступать в перекрестную реакцию с соматическим типом 5.
- v) Испытательный антиген помещают в центральную лунку, а в периферические лунки помещают антисыворотки для различных серотипов. Все геморрагические септицемияльные серотипы (азиатские и африканские) будут реагировать с антисывороткой типа 2. Перекрестные реакции могут возникать с типом 5.

1.2.4. Контр-иммуноэлектрофорез

КИЭФ предлагает быстрый метод идентификации капсулярных типов культур

¹ Бактериальные антигены в смеси покрывают легким минеральным маслом (адьювантом), а затем эмульгируют (стабилизируют) с помощью эмульгатора, в данном случае ланолина (шерстяного жира). Это необходимо сделать, так как водная фаза с бактериями (смесь) не будет смешиваться с масляной фазой (адьювантом). Доля масла для эмульгирующего агента будет варьироваться в зависимости от количества частей ланолина и должна быть соответствующим образом скорректирована. Чем выше содержание ланолина, тем выше стабильность эмульсии

В и Е.

i) *Подготовка капсулярного вещества*

Капсулярное вещество получают таким же образом, как указано для теста ИГА.

ii) *Подготовка гипериммунной антисыворотки*

Антисыворотки готовят у кроликов таким же способом, как и для теста ИГА.

iii) *Среда для КИЭФ*

Среда для КИЭФ состоит из агарозы (2,0 г), барбитонового натрия (2,06 г), диэтилбарбитуровой кислоты (0,37 г), дистиллированной воды (180 мл) и 1/1000 мертиолата (20 мл).

iv) *Веронал-ацетатный буфер (барбитоновый буфер)*

Барбитоновый буфер состоит из барбитонового натрия (29,24 г), безводного ацетата натрия (11,70 г), 0,1 н. Соляной кислоты (180 мл) и дистиллированной воды до 3 л. Значение рН должно составлять 8,8.

v) *Подготовка слайдов*

Пластины для электрофореза получают посредством предварительного покрытия стеклянных предметных стекол (57 мм × 70 мм) объемом среды равным 12 мл. Семь лунок диаметром 4 мм и 7 мм друг от друга вырезаются подряд. Параллельный набор лунок вырезается в 6 мм (от центра к центру) от другого набора лунок.

vi) *Процедура испытания*

В лунку со стороны катода вливают 20 мкл объема капсульного антигена, тогда как равный объем специфической антисыворотки вливают в лунку со стороны анода. Контрольные вещества для данного испытания представляет собой 0,85% раствор хлорида натрия для положительной антисыворотки и капсульный экстракт для отрицательной сыворотки, полученной у кролика, а также положительный и отрицательный контрольные образцы. Резервуар для электрофореза заполняют барбитоновым буфером, рН 8,8. Антиген и антисыворотку подвергают электрофорезу в течение 30 минут при 150 В (25 В/см). Затем планшеты проверяют на линии осадков.

vii) *Интерпретация результатов*

Наличие четкой линии между антигенной и антисывороточной лунками считается положительным результатом.

1.2.5. Тесты на агглютинацию (соматический антиген)

Соматический 'О' антиген получают способом, аналогичным ранее описанному для теста ИГА (Namioka, 1978; Namioka & Murata, 1961b). 6-8-часовую тестовую культуру высевают на агар крови CSY и инкубируют в течение ночи. Культуру собирают в 2-3 мл физиологического раствора, содержащего 0,3% формалина на пластинку, и центрифугируют при 3000 г в течение 15 минут при

4°C (или 1200—1500 г в течение 30-45 минут при комнатной температуре).

Осажденные бактерии ресуспендируют в 25 мл обычного соляного раствора HCl (0,85% физиологического раствора в нормальном растворе HCl), чтобы получить непрозрачность, приблизительно эквивалентную трубе непрозрачности Брауна № 6, и инкубируют в течение ночи. Суспензию снова центрифугируют, надосадочную жидкость отбрасывают и остаток клеток промывают три раза последовательно в фосфатно-буферном солевом растворе (ФБСР) при pH 5,0, 6,0 и 7,0 соответственно.

Наконец, суспензию остаточных клеток, эквивалентную трубе непрозрачности Брауна № 6, получают в ФБСР при pH 7,0. Любые суспензии должны быть отброшены аутоагглютинатом.

Антисыворотки готовят для целых бактериальных клеточных суспензий контрольных штаммов В: 2 (азиатский HS), Е: 2 (африканский HS) и 11: В (австралийский 989, не ГС). Тесты на агглютинацию проводят на слайде, а тестовый антиген используется для трех типов сывороток. Мелкогранулярная агглютинация указывает на специфическую соматическую агглютинацию. Испытания, проводимые для стандартных антигенов, упрощают чтение и интерпретацию. В случае неспецифической частичной агглютинации, тесты, проведенные с десятикратными разведениями сыворотки для теста и стандартных антигенов, помогут идентифицировать соматический антиген.

1.2.6. Обозначение серотипа

Широко используются две системы типизации. Одна из них - «капсулярная» типизация с помощью теста ИГА Картера (Carter, 1955) или тестов AGID (Anon, 1981; Wijewardena et al., 1982). Другая - «соматическая» типизация методом Намиока и Мурата (Namioka, 1978; Namioka & Murata, 1961b, 1961c), а также методом Heddleston et al. (1972). В целом принято считать, что обозначение серотипов должно основываться на соматической капсульной комбинации. Обычно используются две системы - Намиока-Картер и Картер-Хеддлстон. В прежней системе азиатские и африканские серотипы ГС обозначены соответственно 6: В и 6: Е, тогда как в последней системе они обозначаются В.2 и Е.2 соответственно.

1.2.7. Противомикробная чувствительность

Противомикробная чувствительность (ПМЧ) особенно необходима для *P. multocida*, устойчивость к обычно используемым противомикробным агентам которой была рассмотрена Kehrenberg et al. (2001). Методы ПМЧ описаны в главе 3.1. Лабораторные методики тестирования бактериальной антимикробной чувствительности. Метод диффузии дисковых агаров был использован для тестирования распространенных быстрорастущих бактериальных патогенов и, как известно, хорошо работает с *P. multocida* (Bauer et al., 1966). Надежные результаты могут быть получены при испытаниях на диффузию диска, в которых используется стандартизованная методология и измерение диаметра зоны, коррелированное с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК), и поведение штаммов среди клинически восприимчивых и устойчивых категорий. Выбор наиболее подходящих противомикробных препаратов для тестирования - это решение, принимаемое каждой лабораторией в соответствии

с потребностями ветеринарных врачей и лекарствами, доступными для ветеринарного использования в стране. Следующие агенты доказали свою клиническую эффективность: пенициллин, амоксициллин (или ампициллин), цефалотин, цефтиофур, цефкином, стрептомицин, гентамицин, спектиномицин, флорфеникол, тетрациклин, сульфонамиды, триметоприм / сульфаметоксазол, эритромицин, тилмикозин, энрофлоксацин (или другие фторхинолоны) и норфлоксацин.

1.3. Методы распознавания нуклеиновой кислоты

1.3.1. *Pasteurella multocida*-специфический ПЦР-анализ

Технология ПЦР может применяться в отношении быстрой, чувствительной и специфической *P. multocida* и / или для ее обнаружения (Miflin & Blackall, 2001; Townsend et al., 1998a). Быстрота и высокая специфичность двух *P. multocida*-специфических видов анализа (Miflin & Blackall, 2001; Townsend et al., 1998a) обеспечивают оптимальную эффективность без необходимости дополнительной гибридизации. ПЦР, специфичные для *P. multocida* (Miflin & Blackall, 2001; Townsend et al., 1998a) идентифицируют все подвиды *P. multocida*. Miflin & Blackall (Miflin & Blackall, 2001) описывается как ложная позитивная с обоими *P. avium biovar 2* и *P. canis biovar 2*, а Townsend et al. ПЦР (1998a) получили ложный положительный результат *pavis biovar 2* (он не был протестирован для *biovar P. avium 2*). В недавнее время оба *P. avium biovar 2* и *P. canis biovar 2* были переименованы в *P. multocida* (Christensen et al., 2004), что означает, что ПЦР-анализы и Townsend et al. (1998a) и Miflin & Blackall (Miflin & Blackall, 2001) теперь считаются специфичными для *P. multocida*. Остаются некоторые трудности, так как теперь известно, что сахарозно-отрицательные *P. multocida*-подобные организмы в ранах от укусов больших кошек образуют две группы. Хотя оба являются положительными, согласно *P. multocida*-специфичной ПЦР Miflin & Blackall (2001), другими генотипическими методами (Christensen et al., 2005) было установлено, что только одна группа является *P. multocida*. ПЦР Townsend et al. (1998a) описана в следующем абзаце.

Часть изолированной колонии подозреваемого организма переносится непосредственно в смесь ПЦР. Альтернативно, шаблонная ДНК может быть получена из 2 мкл либо смешанной, либо чистой культуры смеси. Все используемые в настоящее время методы получения ДНК-матрицы дают воспроизводимые результаты с праймерами КМТ1 (Townsend et al., 1998a) и позволяют обнаруживать ≤ 10 организмов на реакцию. Чувствительность и специфичность ПЦР-терапии, основанной на *P. multocida*, являются наиболее веским аргументом в пользу использования технологии ПЦР в лабораторных исследованиях возможных случаев ГС. *Pasteurella multocida* может быть обнаружена независимо от чистоты образца, преимущество, если образец получен из тушки старого животного или из миндалин или носового содержимого. В таких случаях мазок следует инокулировать в 2 мл смеси CSY и инкубировать на валике в течение 2-4 часов; 2 мкл культуры затем добавляют непосредственно к смеси ПЦР до амплификации.

Последовательности праймеров (Townsend et al., 1998a):

<i>P.-multocida</i> -специфичная ПЦР:	KMT1T7	5'-ATC-CGC-TAT-TTA-CCC- AGT-GG-3'
	KMT1SP6	5'-GCT-GTA-AAC-GAA-CTC-

Условия ПЦР:

ДНК шаблона добавляют к смеси ПЦР (общий объем 25 мкл), содержащей 1 × ПЦР-буфер, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (dNTP), 2 мМ MgCl₂, 3,2 пмоль каждого праймера и 0,5 мкг ДНК-полимеразы Taq. Параметры термоциклера следующие: начальная денатурация при 95 ° С в течение 5 минут; 30 циклов 95 ° С в течение 1 минуты, 55 ° С в течение 1 минуты, 72 ° С в течение 1 минуты; с окончательным расширением при 72 ° С в течение 7 минут. 5 мкл каждого образца подвергают электрофорезу на 2% агарозном геле в 1 × Трис-ацетатном проточном буфере (ТА) при 4 В / см в течение 1 часа. Гель окрашивают 1% бромидом этидия, а фрагменты ДНК просматривают путем ультрафиолетового просветления.

1.3.2. Мультиплексная капсулярная система типизации ПЦР *Pasteurella multocida*

Идентификация генов, участвующих в биосинтезе полисахаридных капсул *P. multocida* А: 1 (Chung et al., 1998) и В: 2 (Boyce et al., 2000), предоставила необходимую информацию для определения области биосинтеза оставшихся трех серогрупп (D, E и F) (Boyce et al., 2000). Более того, с использованием мультиплексной ПЦР, специфичной для серогруппы, могут быть подтверждены противоречивые результаты в отношении набора некоторых штаммов (Townsend et al., 2000). Благодаря этим знаниям были определены серогрупповые последовательности для использования в качестве праймеров в мультиплексной капсулярной ПЦР-типизации (Townsend et al., 2001). Специфические для *P.-multocida* праймеры включены в качестве внутреннего контроля для идентификации видов. В мультиплексной капсулярной системе типизации ПЦР ампликонная полоса, дающая результат типа, может быть неясной. В таких случаях удаление праймеров *P. multocida* (KMT1T7, KMT1SP6) из смеси может улучшить результат.

Последовательности праймеров (Townsend et al., 2001):

Мультиплексная капсулярная ПЦР:	CAPA-FWD	5'-TGC-CAA-AAT-CGC-AGT-CAG-3'
	CAPA-REV	5'-TTG-CCA-TCA-TTG-TCA-GTG-3'
	CAPB-FWD	5'-CAT-TTA-TCC-AAG-CTC-CAC-C-3'
	CAPB-REV	5'-GCC-CGA-GAG-TTT-CAA-TCC-3'
	CAPD-FWD	5'-TTA-CAA-AAG-AAA-GAC-TAG-GAG-CCC-3'
	CAPD-REV	5'-CAT-CTA-CCC-ACT-CAA-CCA-TAT-CAG-3'
	CAPE-FWD	5'TCC-GCA-GAA-AAT-TAT-TGA-CTC-3'
	CAPE-REV	5'-GCT-TGC-TGC-TTG-ATT-TTG-TC-3'
	CAPF-FWD	5'-AAT-CGG-AGA-ACG-CAG-AAA-TCA-G-3'
	CAPF-REV	5'-TTC-CGC-CGT-CAA-TTA-CTC-TG-3'
	KMT1T7	5'-ATC-CGC-TAT-TTA-CCC-AGT-GG-3'

Размер полученных фрагментов:

Серогруппа А	CAPA-FWD/CAPA-REV	1044 bp
Серогруппа В	CAPB-FWD/CAPB-REV	760 bp
Серогруппа D	CAPD-FWD/CAPD-REV	657 bp
Серогруппа E	CAPE-FWD/CAPE-REV	511 bp
Серогруппа F	CAPF-FWD/CAPF-REV	851 bp

Условия ПЦР:

ДНК-матрицу добавляют к смеси ПЦР (общий объем 25 мкл), содержащей 1 × ПЦР-буфер, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (dNTP), 2 мМ MgCl₂, 3,2 пмоль каждого праймера и 1 мкг ДНК-полимеразы Taq. В оригинальной публикации (Townsend et al., 2001) предлагается использовать стандартную программу циклирования в соответствии с анализом ПЦР, специфичным к *P.-multocida*. Тем не менее, программа циклирования должна быть оптимизирована и проверена для модели используемого термоциклера. Электрофорез в агарозном геле описан выше.

1.3.3. ПЦР-анализ в отношении типа В-специфического, вызывающего ГС

Предполагаемая идентификация типа В-специфического *P. multocida*, вызывающего ГС, также возможна с помощью ПЦР-амплификации (Townsend et al., 1998a). Культуры типа В с преобладающим соматическим антигеном, являющимся либо типом 2, либо 5, идентифицируются путем амплификации фрагмента размером ~ 620 бар посредством праймеров KTSP61 и KTT72.

Последовательности праймеров (Townsend et al., 1998a):

Тип В-специфический ПЦР-анализ KTT72 5'-AGG-CTC-GTT-TGG-ATT-ATG-AAG-3'
в отношении агента, вызывающего
ГС

KTSP61 5'-ATC-CGC-TAA-CAC-ACT-CTC-3'

Условия для ПЦР тип В-специфичной, вызывающей ГС, являются такими, как описано для ПЦР, специфичной для *P. multocida*. Имеются данные о полезности данных праймеров для идентификации штаммов серогруппы В.

Тип В-специфические, ПЦР-праймеры, вызывающие ГС, также могут быть использованы в мультиплексной ПЦР с праймерами, специфичными для *P. multocida*, что значительно сокращает время, необходимое для обнаружения *P. multocida* и предполагаемой идентификации ГС-серотипа. Условия мультиплексной ПЦР являются такими, как описано выше, за исключением того, что используют 3,2 пмоль каждого из четырех праймеров и 1 мкг ДНК-полимеразы Taq. Использование мультиплексной *P. multocida*-специфичной / тип В-специфичной, вызывающей ГС, ПЦР в отношении организмов, вызывающих сомнения, может подтвердить идентичность и позволить получить презумптивный серотип в течение 3-4 часов по сравнению с биохимическим анализом и традиционным серотипированием, которое может

продолжаться до 2 недель.

1.3.4. ПЦР, специфическая для *Pasteurella multocida*, тип А

Имеются данные, что праймеры, используемые для типизации штаммов серогруппы А с несколькими соматическими типами, полезны при специфической идентификации изолятов (Gautam et al., 2004).

Праймеры:

RGPM5: 5'-AAT-GT-TTG-CGA-TAG-TCC-
GTT-AGA-3' RGPM6: 5'-ATT-TGG-CGC-
CAT-ATC-ACA-GTC-3'

Условия ПЦР:

ДНК-матрицу (50 нг) добавляют к смеси ПЦР (общий объем 25 мкл), содержащей 1 × ПЦР-буфер, 200 мкм каждый dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 20 пмоль каждого праймера и 1 единичную ДНК-полимеразу Taq. Стандартные условия амплификации следующие: начальная денатурация при 95 ° С в течение 5 минут; 30 циклов при 95 ° С в течение 45 секунд, 56 ° С в течение 45 секунд, 72 ° С в течение 6 минут. Амплифицированные продукты разделяют электрофорезом в агарозном геле (1,5% агарозного геля) в 0,5 × TBE-буфере при 5 об / см в течение 2 часов.

ПЦР-амплификация дает продукт 564
бар

Тест может быть применен на прямой культуре, в кипящем клеточном лизате и инфицированных тканях.

1.3.5. Генотипическая дифференциация изолятов

Как только предполагаемая (или окончательная) идентификация выполнена, дальнейшая дифференциация изолятов может быть достигнута с помощью генотипических дактилоскопических методов. Анализ рестрикционной эндонуклеазы с ферментом HhaI был признан полезным для характеристики серотипов HS типа. Среди 71 капсульного изолята *P. multocida* серогруппы В было выявлено 20 профилей отпечатков ДНК. Что касается штаммов серогрупп, вызывающих ГС, сообщалось о 13 уникальных профилях среди 54 изолятов, схожих с профилем изначального штамма соматического серотипа 2 (Wilson et al., 1992). Напротив, в то время как среди 13 изолятов серогруппы Е был обнаружен только один профиль HhaI, дифференциация этих штаммов была возможна после переваривания HpaII. По-видимому, HpaII генерирует более мелкие подразделения, чем те, которые были достигнуты с использованием HhaI (Wilson et al., 1995). Риботипирование и большое разделение ДНК с помощью электрофореза в импульсном поле также обеспечивают полезную дискриминацию серогруппы В и Е *P. multocida* (Townsend et al., 1997a). Генетическое разнообразие штаммов *Pasteurella multocida* животного или птичьего происхождения, вызывающих ГС, может быть получено путем анализа последовательности 16S гена рРНК. Исследование, проведенное в Соединенном Королевстве с использованием 79 полевых изолятов, полученных из различных видов, выявило 19 типов рРНК 16S, которые сгруппированы в две отдельные филогенетические линии (Davies,

2004). С другой стороны, анализ последовательностей индийских изолятов серогруппы *V. multocida*, полученных от разных видов животных, не выявил значительных изменений (Dey et al., 2007). Для идентификации разнообразия штаммов бычьего изолята *P. multocida* (Davies et al., 2004) использовалась система мультилокусного секвенирования-типирования (MLST), система типизации, основанная на последовательности семи домашних генов. Однако эти методы в основном используются в исследовательских целях и требуют специализированного оборудования. Кроме того, эти профили не являются уникальными для страны происхождения или видов носителей.

ПЦР-дактилоскопия возможна в любой лаборатории, способной проводить ПЦР, с использованием нескольких методов, ранее применявшихся для дифференциации *P. multocida*. Было показано, что анализ случайной амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) и произвольно праймированной ПЦР (ПП-ПЦР) был полезен для эпидемиологических исследований *P. multocida*, выделенных у кроликов (Chalus-Dancla et al., 1996). ПЦР-анализ с повторяющейся последовательностью *P. multocida* предоставил полезную информацию для выявления изолятов у птиц и свиней, хотя все анализируемые штаммы ГС продемонстрировали схожие профили (Townsend et al., 1997b, 1998b). Однако в недавнее время была обнаружена молекулярная изменчивость среди штаммов, вызывающих ГС, у *P. multocida*, относящихся к серогруппе В. Сообщалось о применении повторяющейся экстрагенической палиндромной (ПЭП) ПЦР, энтеробактериальной повторяющейся интрагенической консенсусной (ЭПИК) ПРЦ и однократной праймерной ПЦР, генотипической дифференциации среди пяти изолятов серогруппы *P. multocida* (Biswas et al., 2004). Анализ RAPD и ПП-ПЦР штаммов *P. multocida*, вызывающих ГС, не был ранее описан.

2. Серологические тесты

Серологические тесты для обнаружения антител обычно не используются для диагностики. Тест ИГА может быть использован для этой цели, следуя методу, близкому к вышеописанному для капсулярной типизации. Высокие титры, обнаруженные при тестировании ИГА, свидетельствуют о недавнем воздействии ГС. Поскольку ГС является заболеванием, которое встречается главным образом у животных, выращенных в условиях несложного земледелия, где системы отчетности о заболеваниях также слабы, оповещения о вспышках заболеваний зачастую поступают со значительной задержкой. Смерть наступает очень внезапно, и на момент направления уведомления туши недоступны для проверки. В таких случаях, высокие титры ИГА от 1/160 до 1/1280 или выше среди животных, контактировавших с зараженными животными и выживших в пораженных стадах, является свидетельством недавнего ГС для целей диагностики.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Исходная информация

1.1. Обоснование и предполагаемое использование продукта

Три типа вакцин, применяемых против ГС, представляют собой бактерии, вакцину, осажденную квасцами (ВОК) и масляную адьювантную вакцину (МAB). Чтобы

обеспечить достаточный иммунитет бактерий, требуется повторная вакцинация. Введение плотных бактерий может привести к шоковым реакциям, которые реже встречаются в случае ВОК и почти не встречаются в случае МАВ.

Живая вакцина ГС, полученная с использованием авирулентного штамма *P. multocida* В: 3,4 (штамм оленя), была использована для борьбы с заболеванием у водных буйволов и крупного рогатого скота и в возрасте 6 месяцев в Мьянме с 1989 года. Она вводится интраназально посредством аэрозоля (Carter et al., 1991; Myint et al., 2005). Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (ФАО) рекомендовала вакцину в качестве безопасной и действенной вакцины для использования в азиатских странах. Тем не менее, отчеты о ее использовании в других странах отсутствуют, и убитые вакцины являются единственными препаратами, которые используются странами, затронутыми ГС.

Рекомендации по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8 «Принципы производства ветеринарных вакцин». Руководящие принципы, приведенные здесь и в главе 1.1.8, носят общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

2. План производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристика семян

2.1.1. Биологические характеристики

Используется локальный изолят *P. multocida*, представляющий превалирующий серотип. Должна поддерживаться хорошо капсулированная, стабильная культура, которая производит большие колонии диаметром приблизительно 2 мм на агаре крови CSY. Семенные культуры следует хранить в виде полутвердых культур, питаемых агаром, при комнатной температуре или в виде лиофилизированных культур.

Теленка инфицируют культурой, и в течение 2-3 часов после его смерти кровь собирают асептически из сердца и хранят при -20 °С в аликвотах по 1 мл. Свежая аликвота используется для каждой новой партии вакцины. Допускается субкультура такой аликвоты однажды или дважды, при условии, что размер колонии не уменьшается. Аликвоту в крови оттаивают, наносят на агар с кровью CSY, и культуру тестируют на агглютируемость соответствующей антисывороткой на слайде. Хорошая культура даст грубую флоккулярную агглютинацию менее чем через 30 секунд. Плохая культура даст только мелкую гранулированную агглютинацию.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних веществ)

Семенные партии должны быть:

- i) *Чистыми: без адвентивных агентов.*
- ii) *Безопасными: не вызывать побочных реакций у целевых видов при использовании согласно рекомендации.*
- iii) *Эффективными: стимулировать эффективный иммунитет, как указано в*

тестах эффективности.

Необходимые тесты описаны в разделе С.2.2.4 ниже.

2.2. Способ изготовления

2.2.1. Процедура

Для производства вакцины необходимы плотные суспензии бактерий. Суспензии должны иметь минимальное содержание бактерий в 1,5 г сухой массы на литр суспензии. Существует два способа получения плотных суспензий. Первая - это культура на твердой среде в колбах Ру и сбор в формализованном физиологическом растворе, благодаря чему могут быть достигнуты суспензии любой плотности. Это трудоемко, поскольку каждая колба должна собираться отдельно и проверяться на чистоту. Второй и рекомендуемый метод - использование большого сосуда с аэрированными культурами в среде, поддерживающей *P. multocida*.

Существует два типа процесса аэрации - путем интенсивного перемешивания и барботирования. Стерильный воздух обеспечивается компрессором. При интенсивном помешивании культура перемешивается валом рабочего колеса, работающим в воздушном потоке, тогда как при аэрации барботажем воздух рассеивается через барботер. Прерывистая аэрация способствует получению более плотной колонии (Thomas, 1968). Чем более тонкодисперсным является воздух, тем лучше рост бактерий. Обычно используют сосуды объемом 20-40 литров, и инкубация происходит при 37 ° С. В системах непрерывной культуры, как только достигается максимальная плотность, как правило, в течение 15 часов, около 25% рабочего объема собирают и заменяют ежедневно. Сбор непрерывных культур осуществляется в относительно небольших объемах в отдельные сосуды, однако через несколько дней плотность уменьшается, предположительно, за счет потери капсульного антигена. По этой причине предпочтительны партии культур. Если сосуды для культивирования инокулируют со скоростью 50 мл / литр среды, максимальная мутность достигается в течение 15-18 часов, когда рост может быть прекращен добавлением формалина до конечной концентрации 0,5%. Такая процедура, в которой используется крупный инокулят, и рост прекращается в течение короткого периода времени, помогает свести к минимуму вероятность заражения. Мутность стандартизирована по отношению к эталону, содержащему эквивалентную сухую массу / объем 1,5 г / л.

Плотные культуры также получают с помощью ферментеров, когда термическая стерилизация резервуаров и культивирование может осуществляться *in situ* с автоматическими устройствами контроля температуры, рН и аэрации. Системы жидкостной стерилизации путем фильтрации, для термолабильных компонентов, также могут быть встроены в ферментер. 100-литровый периодический ферментер способен произвести не менее 66 000 доз (каждые 3 мл) МАВ и более, если плотность достаточно высокая для разбавления до эталонного стандарта, эквивалентного 1,5 г / л, сухой массы / объема.

МАН производится путем эмульгирования равных объемов легкого минерального масла и бактериальной суспензии с 5% безводным ланолином в качестве эмульгатора. Минеральное масло и ланолин сначала стерилизуют и при охлаждении до 40 ° С к смеси добавляют 0,5% формалина. Медленно добавляют бактериальную суспензию и эмульгирование продолжают в течение еще 10 минут. После хранения в течение ночи смесь повторно эмульгируют, разливают в бутылки и хранят в течение 2 недель до использования при 4 ° С.

ВОК готовят, сначала доводя мутность суспензии до эталонного стандарта, как указано выше, и разбавляя ее равным объемом 0,5% формализованного физиологического раствора. РН доводят до 6,5 и добавляют горячий 20% раствор калийного квасца, чтобы получить конечную концентрацию квасцов, равную 1%. После ночного хранения при непрерывном перемешивании вакцина разливается в бутылки для использования.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Подходящей стерилизованной средой для метода аэрированной культуры является казеиновый гидролизат (2 г), сахароза (6 г), дрожжевой экстракт (6 г), хлорид натрия (5 г), безводный дикалий-водород ортофосфат (8,6 г), безводный ортофосфат дигидрата калия (1,36 г) и дистиллированная вода до 1 литра. Более плотную культуру получают, если казеин, сахарозу и дрожжи готовят в виде концентрата, фильтруют или стерилизуют в автоклаве в течение 10 минут при 107 ° С и переносят асептически в резервуар, который ранее подвергали термической стерилизации с остальными ингредиентами.

2.2.3. Внутрисистемный контроль

Необходимо контролировать правильную концентрацию бактериального роста, капсулирование бактерий, чистоту культуры и эффективную деактивацию.

2.2.4. Испытания партии конечного продукта

i) Стерильность и чистота

Испытания биологических материалов на стерильность и свободу от загрязнения описаны в главе 1.1.9.

ii) Безопасность

Два серонегативных представителя крупного рогатого скота вакцинируют дважды рекомендуемой дозой и наблюдают в течение 10-14 дней для обнаружения неблагоприятных эффектов.

Пять мышей инокулируют внутримышечно 0,2 мл каждой вакцины и наблюдают в течение 5 дней. Кровь любой мыши, которая умирает, культивируется для получения *P. multocida*.

iii) Эффективность партии

Тесты действенности могут проводиться любым из следующих способов:

a) Вакцинация крупного рогатого скота с последующим испытанием прямой или пассивной защиты на мышцах с использованием бычьей сыворотки. Эта процедура не является очень действенной, так как

крупному рогатому скоту необходимо длительное время для выработки адекватного иммунитета после МАВ;

- b) Вакцинация кроликов с последующим испытанием прямой или пассивной защиты на мышах с использованием сыворотки кроликов; или
- c) Тесты эффективности на мышах, являющиеся наиболее приемлемым методом из трех.

Каждая из 50 мышей вакцинируется внутримышечно 0,2 мл вакцины и повторно вакцинируется через 14 дней. На 21-й день мышей делят на десять групп по пять, каждая группа подвергается испытанию с соответствующими разведениями 6-8-часовой культуры смеси полевого штамма в диапазоне 10^{-1} - 10^{-10} ; 50 невакцинированных подконтрольных мышей также подвергают испытанию, и все мыши наблюдаются в течение 5 дней. Затем можно рассчитать среднюю летальную дозу (LD50), чтобы получить дозу, достаточную для защиты крупного рогатого скота: вакцины, полученные описанным образом, дают, по меньшей мере, 10^4 единицы защиты у вакцинированных мышей.

2.3. Требования к авторизации

2.3.1. Требования безопасности

- i) Безопасность целевых и нецелевых животных
См. главу 1.1.8.
- ii) Реверсия к вирулентности для аттенуированных / живых вакцин
См. главу 1.1.8.
- iii) Экологическое обоснование
См. главу 1.1.8.

2.3.2. Требования к эффективности

- i) Для выращивания животных

Одна доза вакцины, вводимая молодым телятам в возрасте 4-6 месяцев, защитит восприимчивых животных в течение 3-4 месяцев прАРВ, и в течение использования ВОК, и 6-9 месяцев при использовании МАВ.

Вакцину следует вводить путем глубокой внутримышечной инъекции. Рекомендуется использовать нейлоновые шприцы объемом 5 мл для дозы 3 мл и иглы калибра 14-15; рекомендованный возраст для первичной вакцинации - 4-6 месяцев. Для обычной профилактической вакцинации рекомендуется разовая доза МАВ через 4-6 месяцев, бустер через 3-6 месяцев и ежегодная ревакцинация. В тех случаях, когда практика ведения сельского хозяйства такова, что осмотр отдельных животных в

надлежащее время является неосуществимым, рекомендуется ежегодная вакцинация всех животных в возрасте старше 4 месяцев, предпочтительно до сезона размножения, и вакцинация всех телят в возрасте до 1 года, через 6 месяцев. В условиях вспышки у вакцинированных животных рекомендуется введение одной дозы ВОК, с последующим введением 1 дозы МАВ.

Утечка МАВ в подкожную клетчатку может иногда приводить к образованию фиброзных опухолей в местах инъекции. В редких случаях могут развиваться абсцессы при несоблюдении условий стерильности, хотя большинство животных устойчивы к таким инфекциям. В отдельных случаях ВОК может вызывать шоковые реакции.

ii) Контроль и устранение

Не применимо.

2.3.3. Устойчивость

Эмульсия МАВ должна быть чистой белой и прилипать к стеклу, как краска. Если эмульсия имеет признаки растрескивания, ее следует утилизировать. Допускается образование тонкого слоя масла на поверхности. Ее можно хранить при 4-8 °С в течение 6 месяцев без какой-либо значительной потери действенности. Эмульсию нельзя замораживать. Увеличение содержания ланолина улучшает устойчивость, но также увеличивает вязкость, что является явным недостатком. Использование других эмульгаторов, таких как «Арлацель», способствует получению более тонких, устойчивых эмульсий.

3. Вакцины на основе биотехнологии

Не применимо в настоящий момент.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- AALBÆK B., ERIKSEN L., RIMLER R. B., LEIFSSON P. S., BASSE A., CHRISTIANSEN T. & ERIKSEN E. (2009). Typing of *Pasteurella multocida* from haemorrhagic septicaemia in Danish fallow deer (*Dama dama*). *APMIS*, **107**, 913–920.
- ANON (1981). Simple serological technique recommended for HS diagnosis. *Asian Livestock*, **6**, 41–42.
- BAIN R.V.S., DE ALWIS M.C.L., CARTER G.R. & GUPTA B.K. (1982). Haemorrhagic Septicaemia. FAO Animal Production and Health Paper No. 33. FAO, Rome, Italy.
- BAUER A.W., KIRBY W.M.M., SHERRIS J.C. & TURCK M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493–496
- BISWAS A., SHIVACHANDRA S.B., SAXENA M.K., KUMAR A.A., SINGH V.P. & SRIVASTAVA S.K. (2004). Molecular variability among strains of *P. multocida* isolated from an outbreak of haemorrhagic septicaemia in India. *Vet. Res. Commun.*, **28**, 287–298.
- BOYCE J.D., CHUNG J.Y. & ADLER B. (2000). Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Vet. Microbiol.*, **72**, 121–134.

- CARIGAN M.J., DAWKINS H.J.S., COCKRAM E.A & HANSEN A.T. (1991). *P. multocida* septicaemia in fallow deer. *Aust. Vet. J.*, **68**, 201–203.
- CARTER G.R. (1955). A haemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 481–484.
- CARTER G.R. & CHENGAPPA M.M. (1980). Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of haemorrhagic septicaemia. *J. Clin. Microbiol.*, **11**, 94–96.
- CARTER G.R. & CHENGAPPA M.M. (1981). Identification of type B and E *Pasteurella multocida* by counterimmuno- electrophoresis. *Vet. Rec.*, **108**, 145–146.
- CARTER G.R. & DE ALWIS M.C.L. (1989). Haemorrhagic septicaemia. In: *Pasteurella* and *Pasteurellosis*, Adlam C. & Rutter J.M., eds. Academic Press, London, UK, 131–160.
- CARTER G.R., MYINT A., VAN KHAR R. & KHIN A. (1991). Immunisation of cattle and buffaloes with live haemorrhagic septicaemia vaccine. *Vet. Rec.*, **129**, 203.
- CHASLUS-DANCLA E., LESAGE-DESCAUSES M.C., LEROY-SETRIN S., MARTEL J.L., COUDERT P. & LAFONT J.P. (1996). Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **52**, 91–102.
- CHRISTENSEN H., ANGEN O., OLSEN J.E. & BISGAARD M. (2004). Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiol.*, **150**, 1757–1767.
- CHRISTENSEN H., BISGAARD M., ANGEN O., FREDERIKSEN W. & OLSEN J. E. (2005). Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 259–270.
- CHUNG J.Y., ZHANG Y. & ADLER B. (1998). The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **166**, 289–296.
- DAVIES R.L. (2004). Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology*, **150**, 4199–4210.
- DAVIES R.L. MACCORQUODALE R. & REILLY S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiol.*, **99**, 145–158.
- DE ALWIS M.C.L. (1992). Haemorrhagic septicaemia – a general review. *Br. Vet. J.*, **148**, 99–112.
- DEY S., SINGH V.P., KUMAR A.A., SHARMA B., SRIVASTAVA S.K. & SINGH N. (2007). Comparative sequence analysis of 16S rRNA gene of *Pasteurella multocida* serogroup B isolates from different animal species. *Res. Vet.Sci.*, **83** (1), 1–4.
- GAUTAM R., KUMAR A.A., SINGH V.P., SINGH VIJENDRA P., DUTTA T.K. & SHIVCHANDRA S.B. (2004). Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup A isolates by PCR assay. *Res. Vet. Sci.*, **76**, 179–185.
- HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1972). Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, **16**, 925–936.
- KEHRENBURG C., SCHULZE-TANZIL G., MARTEL J.-L., DANCLA E.C. & SCHWARZ S.

- (2001). Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet. Res.*, **32**, 323–339.
- KUMAR A.A., HARBOLA P.C., RIMLER R.B. & KUMAR P.N. (1996). Studies on *Pasteurella multocida* isolates of animal and avian origin from India. *Ind. J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.*, **17**, 120–124.
- MIFLIN J.K. & BLACKALL P.J. (2001). Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Let. Appl. Microbiol.*, **33**, 216–221.
- MUSTAFA A.A., GHALIB H.W. & SHIGIDI M.T. (1978). Carrier rate of *Pasteurella multocida* in a cattle herd associated with an outbreak of haemorrhagic septicaemia in the Sudan. *Br. Vet. J.*, **134**, 375–378.
- MYINT A., JONES T.O. & NYUNT H.H. (2005). Safety, efficacy and cross-protectivity of a live intranasal aerosol haemorrhagic septicaemia. *Vet. Rec.*, **156**, 41–45.
- NAMIOKA S. (1978). *Pasteurella multocida*. Biochemical characteristics and serotypes. In: *Methods in Microbiology*, 10. Academic Press, London, UK, 272–292.
- NAMIOKA S. & MURATA M. (1961a). Serological studies on *Pasteurella multocida*. I: a simplified method of capsular typing of the organism. *Cornell Vet.*, **51**, 498–507.
- NAMIOKA S. & MURATA M. (1961b). Serological studies on *Pasteurella multocida*. II: characteristics of the somatic (O) antigen of the organism. *Cornell Vet.*, **51**, 507–521.
- NAMIOKA S. & MURATA M. (1961c). Serological studies on *Pasteurella multocida*. III. O antigenic analysis of cultures isolated from various animals. *Cornell Vet.*, **51**, 522–528.
- RHOADES K.R. & RIMLER R.B. (1987). Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Dis.*, **31**, 895–898.
- ROSEN M.N. (1981). *Pasteurellosis Infectious Diseases of Wild Animals*, Second Ed. Davis J.B., Karstak L.H. & Trainer D.O., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 244–252.
- SAWADA T., RIMLER R.B. & RHOADES K.P. (1985). Haemorrhagic septicaemia: naturally acquired antibodies against *Pasteurella multocida* types B and E in calves in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 1247–1250.
- SINGH V.P., KUMAR A.A., SRIVASTAVA S.K. & RATHORE B.S. (1996). Significance of HS in Asia: India. International Workshop on Diagnosis and Control of HS. Bali, Indonesia, Indonesian Department of Agriculture, 28–30 May, 1999, p.16.
- THOMAS J. (1968). Studies on haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine. I. Methods of production. *Kajian Vet. Malaysia–Singapore*, **1**, 152–158.
- TOWNSEND K.M., BOYCE J.D., CHUNG J.Y., FROST A.J. & ADLER B. (2001). Genetic organisation of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 924–929.
- TOWNSEND K.M., DAWKINS H.J.S. & PAPADIMITRIOU J.M. (1997a). Analysis of haemorrhagic septicaemia-causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alternation gel electrophoresis (FAGE). *Vet. Microbiol.*, **57**, 383–395.
- TOWNSEND K.M., DAWKINS H.J.S. & PAPADIMITRIOU J.M. (1997b). REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia. *Res. Vet. Sci.*, **63**, 151–155.

- TOWNSEND K.M., FROST A.J., LEE C.W., PAPADIMITRIOU J.M. & DAWKINS H.J.S. (1998a). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1096–1100.
- TOWNSEND K.M., O'BOYLE D., PHAN T.T., HANH T.X., WIJewardana T.G., WILKIE I., TRUNG N.T. & FROST A.J. (1998b). Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Vet. Microbiol.*, **63**, 205–215.
- WIJewardana T.G., DE ALWIS M.C.L. & BASTIANZ H.L.G. (1986). Cultural, biochemical and pathogenicity studies on strains of *Pasteurella multocida* isolated from carrier animals and outbreaks of haemorrhagic septicaemia. *Sri Lanka Vet. J.*, **34**, 43–57.
- WIJewardana T.G., DE ALWIS M.C.L. & VIPULASIRI A.A. (1982). An agar gel diffusion test for rapid identification of *Pasteurella multocida* type B (Carter). *Sri Lanka Vet. J.*, **30**, 12–14.
- WILSON M.A., DUNCAN R.M., NORDHOLM G.E. & BERLOWSKI B.M. (1995). *Pasteurella multocida* isolated from wild birds of North America; A serotype and DNA fingerprint study of isolates from 1978 to 1993. *Avian Dis.*, **39**, 587–593.
- WILSON M.A., RIMLER R.B. & HOFFMAN L.J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1518–1524.

*

* *