**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 годы |
| **Актуальность** | Пастереллез (Pasteurellosis)- группа зоонозных инфекционных болезней, вызываемых организмами рода Pasteurella. Восприимчивы все виды технологических животных и птицы.  Приобрела острую актуальность в последние годы в связи с новыми технологиями выращивания животных и интенсивным развитием отраслей. Основной мерой профилактики пастереллезов является вакцинация. По антигенному составу Pasteurella multocida разделена на 4 серогруппы (A, B, D и Е) по капсульному полисахаридному антигену и 16 соматических  антигенов по липополисахаридному антигену (протеин наружной мембраны OmpH) которые обозначают цифрами. Факторы патогенности - капсульный полисахарид, протеин наружной мембраны H (OmpH, экзо- и эндотоксины токсины (пирогенный лейкотоксин, липополисахаридный комплекс, и дермонекротизирующие токсины toxA), гемагглютинин и  фимбрии также играющие роль в патогенезе заболевания.  Патогенные и вирулентные свойства различных серогрупп и серотипов возбудителя у различных видов животных колеблются в широких пределах и являются важным маркером для определения их роли в развитии болезни. Типирование штаммов P. multocida по серогрупповой, серотиповой и токсигенной активности является важным условием для усовершенствования методов контроля качества и разработки новых вакцин на основе эпизоотически значимых вариантов.  Анализ действующих НД на отечественные вакцины против пастереллеза животных выявил недостаточный уровень требований к данной группе препаратов. В отечественной  биотехнологии производства вакцин и сывороток против пастереллеза животных используют ограниченное число штаммов пастерелл серогрупп А, В и D без определения их серотиповой принадлежности по соматическому антигену OmpH и потенциальной способности к токсинообразованию, которые профилактируют проявление острого (септического) пастереллеза, но не исключают или не предотвращают инфекцию. Испытания препаратов данной группы по показателям «Иммуногенная активность» в соответствии с различными НД выполняются по 5 отличающимся методикам. Отличия в методах испытаний касаются выбора  целевых животных, выбора заражающего штамма, величины заражающей дозы (ЛД-50), способа оценки иммуногенной активности. Все эти обстоятельства создают затруднения при проведении государственного контроля вакцин и сывороток против пастереллеза животных:  1) увеличивают  сроки проведения контроля;  2) повышают материальные затраты и стоимость анализа;  3) затрудняют сравнительную оценку препаратов различных производителей.  До настоящего времени основным способом типирования штаммов и изолятов Р. multocida является тест на выявление гиалуроновой кислоты в капсуле пастерелл серогруппы А с  последующей дифференциацией капсульных серотипов В и D по типу реакции в трипафлавиновой пробе. К недостаткам данного способа относятся субъективность оценки результатов и вероятность возникновения спонтанных мутаций, приводящих к появлению безкапсульных вариантов бактерии, что приводит к невозможности их типирования по данному способу. Типирование пастерелл по серотипам в отечественной практике не проводится в виду отсутствия коммерческих средств и наборов для серотипирования бактерий. Также отсутствуют данные об изучении последовательностей гена протеина OmpH и частоте его выявления у изолятов, выделенных от больных животных Традиционная биопроба на лабораторных животных не позволяет дифференцировать тип токсина, вырабатываемого конкретным штаммом пастерелл.  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, лейкотоксин и дермонекротизирующий токсин молекулярно-генетическими методами.  Таким образом, возникла необходимость провести типирование серовариантов и детектирования токсигенных вариантов вакцинны, и музейных и эпизоотических штаммов  Рasteurella multocida биохимическим, биологическим методом и методом ПЦР с целью усовершенствования методов контроля качества лечебно-профилактических препаратов против пастереллеза животных.Это позволит унифицировать методы контроля, снизить материальные затраты, сократить сроки исследований и учитывать антигенную разнородность при определении способности коммерческих вакцин защищать животных от пастереллеза и проводить сравнительную оценкупрепаратов различных производителей В этой связи сравнение специфичности биохимических, биологических и молекулярно-генетических методов типирования капсулярных серовариантов пастерелл и детектирования токсигенных вариантов P. multocida является актуальным. |
| **Цель исследования** | Провести биохимическое, биологическое и молекулярно-генетическое типирование вакцинных, музейных и эпизоотических штаммов пастерелл по серотипам и серовариантам, выделить токсигенные варианты по продукции дерматонекротического токсина, сравнить полученные профили штаммов пастерелл, оценить чувствительность лабораторных животных, разработать унифицированные методики оценки иммуногенной активности иммунобиологических препаратов против пастереллеза животных и дать предложения для повышения эффективности эпизоотического мониторинга. |
| **Планируемые результаты** | Будут разработаны унифицированные методики оценки иммуногенной активности иммунобиологических препаратов против пастереллеза животных, которые позволят сократить  сроки исследований, уменьшить материальные затраты и стоимость анализа.  Будут разработаны методические рекомендации по методам типирования штаммов пастерелл по серогрупповой, серовариантной принадлежности и продукции дермонекротизирующего токсина (toxA) биохимическими, биологическими и молекулярно-генетическими методами.  Разработка комплексного подхода к типированию серовариантов и детектированию токсигенных вариантов (toxA) Pasterella multocida биохимическим, биологическим и методом  ПЦР позволит повысить эффективность и надежность идентификации штаммов, и решить вопрос о совпадении генетических и антигенных типов пастерелл, циркулирующих в хозяйствах, с типами возбудителей, присутствующих в вакцинах, выявлять сероварианты, против которых вакцины не эффективны; определять потенциальную опасность таких сероваров для животных. Унифицированные методики оценки иммуногенной активности препаратов против пастереллеза животных, позволят сократить сроки проведения исследований, уменьшить материальные затраты и стоимость анализа, контролировать эффективность и безопасность  иммунобиологических лекарственных средств против пастреллезов животных разных видов, защитить рынок государств-участников Таможенного союза от поступления некачественной  продукции. |