

17. Nikitin, A.F., Zhogolev, D.T. & Zaharkiv, J.F. (1998). Laboratornaja diagnostika parazitarnyh boleznej [Laboratory diagnostics of parasitic diseases]. *Med. Tehnologii –Med. technology*, 1, 327-388 [in Russian].

18. Cherkasova, O.,A. Shirjakova, T.A., Ioffe, N.V. & Burak, I.I. (2008). Dezinvazirujushhie svojstva anolita nejtralnogo na jajca gelmintov [Disinfecting properties of anolyte neutral for eggs helminths]. *Parazitarnye bolezni cheloveka, zhivotnyh i rastenij: tr. IV mezhdunar. nauchno prakt. Konf. – Parasitic diseases of humans, animals and plants: tr. IV Intern. scientific and practical work. Conf., Vitebsk*, 185–188 [in Russian].

19. Bogach, M.V. (2003). Vivchennja dezinvazijnogo zasobu pri asociativnih hvorobah ptici [Study of a disinvasive agent in association with poultry diseases]. *Zbirn. nauk. prac. Luganskogo NAU – Collection scientific works of Lugansk NAU*, 31/43, 89-92 [in Ukraine].

20. Novikov, N.L. & Cherepanov, A. A. (2003). Skrining preparatov dlja obezzarazhivaniya tverdyh poverhnostej v pomeshhenijah i na obektah zhivotnovodstva [Screening of preparations for decontamination of hard surfaces in premises and at livestock facilities], *Teorija i praktika borby s parazitarnimi boleznyami: mater. dokl. nauch. konf. – Theory and practice of combating parasitic diseases: mater. doc. sci. conf.*, 4, 294-296 [in Russian].

**УДК 619:615.31-619:579.843.95-636.91**

**НОВИКОВА О.Н.**, канд. вет. наук;

**ЛОМАКО Ю.В.**, канд. вет. наук, доцент

**БЕЛЯНКО Д.Л.**, мл. науч.с.

E. mail: oksana 68on@mail.ru

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,*

*г.Минск, Беларусь*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЛЕЙКОТОКСИНУ MANNHEIMIA HAEMOLYTICA У МОРСКИХ СВИНОК В ТЕСТ-СИСТЕМЕ ИФА**

*В статье приведены результаты по определению уровня поствакцинальных антител к лейкотоксину *M. haemolytica* в сыворотке крови морских свинок. Разработаны основные критерии валидации цифровых данных, полученных в ИФА, с последующей оценкой иммуногенной активности вакцинного препарата. Основным критерием оценки уровня поствакцинальных специфических антител в сыворотке крови иммунизированных животных является значение показателя С/П. Значение С/П.  $\geq 50\%$  является положительным. По результатам ИФА значение С/П для парных сывороток крови морских свинок, иммунизированных экспериментальным образцом вакцины, составило 63,0% и 67,9%.*

**Ключевые слова.** лейкотоксин *M. haemolytica*, поствакцинальные антитела, морские свинки, ИФА.

**Введение.** *Mannheimia haemolytica* (род *Pasterellaceae*, семейство *Mannheimia*) является условно-патогенным микроорганизмом, который у здоровых животных обитает в верхних дыхательных путях и заглочных лимфоузлах. Различные стресс-факторы, вирусные инфекции, микоплазмозы и паразитарные заболевания приводят к снижению иммунного статуса и активации факторов вирулентности микроорганизмов [1]. К основным факторам

вирулентности *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) относят лейкотоксин, факторы адгезии, липополисахариды, капсульные полисахариды и различные протеины наружной клеточной мембраны [2].

Лейкотоксин (Lkt) имеет молекулярный вес 105 kDa активно секретируется всеми серотипами *M. haemolytica* в логарифмическую фазу роста в среде ферментирования [3, 4]. Lkt имеет  $\beta_2$  рецепторы адгезии только на лейкоцитах жвачных видов животных [5]. При этом процесс адгезии сопровождается высвобождением лизосомальных ферментов и токсичных для клетки свободных радикалов кислорода, что является пусковым механизмом воспалительной реакции, которая проявляется в виде фибринозно-некротического повреждения легких [6, 7].

Известно, что высокий уровень антител к Lkt коррелирует с устойчивостью животных к заболеванию. Таким образом, включение Lkt в виде анатоксина или рекомбинантного специфического протеина в состав вакцинных препаратов для профилактики легочного пастереллеза, обусловленного *M. haemolytica*, может существенно повысить эффективность их применения [8, 9].

При конструировании и производстве вакцинного препарата важным этапом является разработка методов контроля иммуногенной активности антигенов, входящих в его состав, на лабораторных животных.

В настоящее время отсутствуют коммерческие наборы ИФА для количественной оценки поствакцинальных антител к Lkt у лабораторных животных. В связи с этим создание лабораторной модели для оценки уровня поствакцинальных антител к Lkt *M. haemolytica* является актуальной задачей.

**Цель работы.** Определить уровень поствакцинальных антител к Lkt *M. haemolytica* у морских свинок в тест-системе ИФА.

**Материалы и методы исследований.** В супернатанте *M. haemolytica*, полученном в процессе ферментирования бактерий в биореакторе, определено количественное содержание Lkt [3]. Для оценки иммуногенных свойств Lkt сконструировано три экспериментальных образца: 1-й образец с содержанием Lkt – 1,3 мкг/1,0 мл, 2-й образец с содержанием Lkt – 0,6 мкг/1,0 мл с дополнительным включением инактивированных корпускулярных антигенов - *Mannheimia haemolytica* (КМИЭВ – В158) и *Pasteurella multocida* (КМИЭВ-В166), 3-й образец - эмульсия адьюванта с ЗФР в соотношении 1:1. В качестве адьюванта использовали Montanide ISA 206 VG (Seppic, Франция). Массовая доля антигенной части в образцах №1 и №2 составила 50%.

Для изучения иммуногенных свойств экспериментальных образцов сформированы три группы морских свинок (массой 200±10г) по 5 голов в каждой. Опытных морских свинок иммунизировали экспериментальными образцами №1(положительный контроль -  $K^+$ ) и №2 (опытные образцы сыворотки крови –  $O^+$ ) в объеме 1,0 мл подкожно в область холки, контрольной группе животных по аналогичной схеме вводили образец №3 (отрицательный контроль –  $K^-$ ). Кровь отбирали у морских свинок из сердца на 14 –е и 21-е сутки после иммунизации.

Получение антигена Lkt *M. haemolytica* для постановки ИФА.

Lkt *M. haemolytica* был получен в логарифмическую фазу роста микроорганизмов в обогащенной среде RPMI 1640 с последующим отделением супернатанта и стерилизующей фильтрации (Millipore 0,22 $\mu$ m).

Полученный бесклеточный супернатант концентрировали в центрифужных фильтрах (Amicon Ultra-15) с фильтрующей мембраной 50K, концентрат подвергали гельфильтрации на колонке LKB Bromma 2238 Uvicord. В полученных после гельфильтрации фракциях на

спектрофотометре при довжині хвилі 280 нм визначали кількість білка і проводили їх індивідуальну імунохімічну ідентифікацію в прямому варіанті ІФА з використанням специфічних поліклональних антител к Lkt (HRP) (MyBioSource, США), в якості стандарту використовували рекомбінантний Lkt (MyBioSource, США). Фракції з найбільшою ступенню специфічної активності об'єднували в пул, визначали концентрацію білка методом Бредфорд і використовували в якості антигену для сенсibiliзації планшету.

Для визначення поствакцинальних антител в сировотці крові морських свинок використовували непрямий варіант ІФА з заключительним внесенням в лунки робочого розведення (1:30000) антивидового глобулінового кон'югату морської свинки (HRP) (Sigma). Кожен зразок сировотки крові випробували в розведенні 1:100 в 2-х повторах (M±m). В якості субстратного буфера використовували ТМБ. Учет результатів ІФА проводили, вимірюючи оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм.

Статистична обробка експериментальних даних вироблялась з допомогою критерію t-Ст'юдента для незалежних вибірок.

**Результати досліджень і їх обговорення.** Для коректного урахування результатів реакції визначені основні критерії валідації (к.в.) тест-системи ІФА. К.в.1 - відношення між середнєарифметическими показателями оптичної щільності зразків позитивної (зразок №1) і негативної (зразок №3) сировоток крові  $\Delta ОП (K^+/K^-) \geq 2,0$ . Значення співвідношення  $\Delta ОП K^+ / K^-$  на 14-й і 21-й дні після імунізації склали, відповідно, 4,9 і 5,8. Результати дослідження показані в таблиці 1.

Таблиця 1

**Результати дослідження сировоток крові морських свинок в тест-системі ІФА**

Імунізація зразком	Значення $\Delta ОП$ , усл.ед (M±m)	
	14-й дні після імунізації	21-й дні після імунізації
№1 ( $K^+$ )	0,608±0,09	0,697±0,07
№2 ( $O^+$ )	0,430±0,06	0,512±0,09
№3 ( $K^-$ )	0,124±0,087	0,120±0,09

Для розрахунку показателя значення зразків до позитивного контролю нами була розроблена формула:

$$C/P \% = 100 \times \frac{\Delta ОП o^+ - \Delta ОП K^-}{\Delta ОП K^+ - \Delta ОП K^-}$$

Де C/P – показник значення зразків до позитивного контролю (%);

-  $\Delta ОП O^+$  – середнєарифметическе значення оптичної щільності зразків, усл. ед.;

-  $\Delta ОП K^-$  – середнєарифметическе значення оптичної щільності негативного контролю, усл. ед.;

-  $\Delta ОП K^+$  – середнєарифметическе значення оптичної щільності позитивного контролю, усл. ед.

Интерпретацию полученных результатов осуществляли по следующим критериям:

Если С/П составляет  $< 50\%$  – результат является отрицательным.

Если С/П составляет  $\geq 50\%$  – результат является положительным.

Расчет С/П осуществляли при условии, если отношение между среднеарифметическими показателями оптической плотности экспериментальных образцов сывороток крови (образец №2) и отрицательным контролем (образец №3)  $\Delta OP (O^+/K^-) \geq 2,0$  (к.в. 2). Значение соотношения  $\Delta OP O^+/K^-$  на 14-е и 21-е сутки после иммунизации составило, соответственно, 3,6 и 4,2, что позволило продолжить вычисления С/П по формуле.

Показатель значения С/П парных сывороток (образец №2) при расчете цифровых данных составил 63,0% и 67,9%, что свидетельствовало о достаточно высоком уровне специфических антител в сыворотке крови иммунизированных животных.

**Выводы и перспективы дальнейших исследований.** В тест-системе ИФА = был определен уровень поствакцинальных антител в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных Lkt. Разработаны промежуточные критерии валидации для подсчета цифровых данных, полученных в ИФА, с последующей оценкой уровня поствакцинальных антител в сыворотке крови иммунизированных животных. Основным критерием оценки уровня поствакцинальных специфических антител было значение показателя С/П, который отражал иммуногенную активность вакцины. По результатам экспериментальной работы значения С/П парных образцов сыворотки крови морских свинок, иммунизированных экспериментальным образцом вакцины, составили 63,0% и 67,9%, что дало возможность сделать заключение о высокой иммуногенной активности Lkt -содержащего экспериментального образца вакцины.

Разработанная нами экспериментальная модель количественного определения поствакцинальных антител к Lkt дает возможность проведения контроля иммуногенных свойств вакцинных препаратов с включением Lkt и позволяет частично стандартизировать биотехнологические этапы их производства.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frank G.H. Pasteurellosis of cattle. In *Pasteurella and pasteurellosis*. Adlam C.F. and Rutter J.M. // Ed. New York, Academic Press.– 1989 – P.197-122.
2. Rice J.A., Carrasco-Medina L., Hodgins D.C., Shewen P.E. Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease.// *Anim. Health Res. Rev.* – 2007. – Vol.8 (2). – P.117-128.
3. Новикова О.Н., Ломако Ю.В., Белянко Д.Л. Разработка тест-системы ИФА для иммунохимической идентификации и определения количественного содержания лейкотоксина Mannheimia haemolytica в среде ферментирования // *Современные научно-практические решения в АПК: электронный сборник статей, Россия, г.Тюмень, 8.12. 2017.* – С.212.
4. Shewen P.E., Wilkie B.N. Evidence for the Pasteurella haemolytica cytotoxin as a product of actively growing bacteria.// *Am. J. Vet. Res.* – 1985. – Vol. 46(5). – P1212–1214.
5. Thumbikat P., Dileepan T., Kannan M.S., Maherswaran S.K., Characterisation of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica Leukotoxin integration with bovine alveolar macrophage beta2 integrins.//*Vet. Res.*- 2005. – Vol. 36. – P.771-786.
6. Zecchion L., Felt T., Desmecht D. How Mannheimia haemolytica defeats host defence through a kiss of a death mechanism.// *Vet. Res.* – 2005. – Vol. 36(2). – P.133-136.
7. Clinkenbeard K.D., Mosier D.A., Confer A.W. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by Pasteurella haemolytica leukotoxin.// *Infection and immunity.* – 1989. – Vol.57. – P.420-425.

8. Confer A.W., Ayalew S., Montelongo M., et.al. Immunity of cattle following vaccination with a Mannheimia haemolytica chimeric PIpE-LKT (SAC89) protein.// Vaccine.-2009. – Vol.27. – P.1771-1776.

9. Oppermann T., Busse N., Czenak P. Mannheimia haemolytica growth and leukotoxin production for vaccine manufacturing. – A bioprocess review.// Electronic journal biotechnology. – 2017. – Vol. 28. – P. 95-100.

**ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО ЛЕЙКОТОКСИНУ MANNHEIMIA HAEMOLYTICA У МОРСЬКИХ СВИНОК В ТЕСТ-СИСТЕМІ ІФА / Новікова О.Н., Ломако Ю.В., Белянко Д.Л.**

У статті наведені результати по визначенню рівня поствакцинальних антитіл до лейкотоксину *M. haemolytica* в сироватці крові морських свинок. Розроблено основні критерії валідації цифрових даних, отриманих в ІФА, з подальшою оцінкою імуногенної активності вакцинного препарату. Основним критерієм оцінки рівня поствакцинальних специфічних антитіл в сироватці крові імунізованих тварин є значення показника С / П. Значення С / П.  $\geq 50\%$  є позитивним. За результатами ІФА значення С / П для парних сироваток крові морських свинок, імунізованих експериментальним зразком вакцини, склали 63,0% і 67,9%.

**Ключові слова:** лейкотоксин *M. haemolytica*, поствакцинальні антитіла, морські свинки, ІФА.

**DETERMINATION IN GUINEA PIGS THE LEVEL OF POSTVACCINAL ANTIBODIES TO MANNHEIMIA HAEMOLYTICA LEUKOTOXIN IN ELISA KIT / Novikova O.N., LamakaYu.V., Belianka D.L.**

*Mannheimia haemolytica* is one of the main agents responsible for fibrinouse pleuropneumonia in young calves and dairy cattle. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin (Lkt) is the main virulence factor which to play an important role in the protective immunity. Creation of the new vaccines with Lkt in it is the perspective direction to evaluate the efficacy of their using. In order to obtain data concerning the influence the Lkt immunization on the level of antibodies production in g. pigs we used an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The procedure of subcutaneous immunization was conducted in guinea pigs with using of three samples: sample №1 concluded only Lkt (positive control –K+), sample № 2 concluded Lkt and two other bacterial antigens –*M. haemolytica* and *P. multocida* (experimental vaccine

sample +), sample №3 was as a negative control (50% emulsion of Montanide ISA 206 VG). Paired serum samples were collected from g. pigs on 14 and 21 p.i. day. The antigen for ELISA was a purified in-house preparation of Lkt. For ELISA wells of plates were coated with 0,9  $\mu\text{g}$  Lkt per well, serum samples were diluted 1:100.

The data obtained in ELISA were then calculation. The validity criterias were  $\Delta\text{OD} (K^+/K^-) \geq 2,0$  and  $\Delta\text{OD} (\text{Sample}^+/K) \geq 2,0$ . The data  $\Delta\text{OD} (K^+/K)$  for paired serum sample (№2) were 4,9 and 5,8;  $\Delta\text{OD} (\text{Sample}^+/K) - 3,6$  and 4,2. The main criteria for level of postvaccinal antibodies in g. pig's blood was S/P. The results were positive if  $S/P \geq 50\%$ . The results S/P for paired serum sample of g. pigs, immunization with sample of the experimental vaccine, were 63,0% and 67,9%.

Quantity determination in g. pigs the level of postvaccinal antibodies to *M. haemolytica* Lkt is able to conduct the laboratory control of Lkt immunogenic activity as well as provides particularly standartisation of biotechnology process leukotoxin production for vaccine manufacturing.

**Key words.** Leukotoxin *M. haemolytica*, postvaccinal antibodies, guinea pigs, ELISA

**REFERENCES**

1. Frank G.H. (1989) Pasteurellosis of cattle. In Pasteurella and pasteurellosis . Adlam C.F. and Rutter J.M. Ed. New York, Academic Press., P.197 [in English].

2. Rice J.A., Carrasco-Medina L., Hodgins D.C., & Shewen P.E. (2007) Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. *Anim. Health Res. Rev.*, 8 (2), 117 [in English].
3. Novikova O.N., Lomako Ju.V., Beljanko D.L. (2017) Razrabotka test-sistemy IFA dlja immunohimicheskoy identifikacii i opredelenija kolichestvennogo sodержanija leukotoksina Mannheimia haemolytica v srede fermentirovaniya [Development of ELISA kit for immunochemical identification and quantity detection of Mannheimia haemolytica leukotoxin in fermentation media]. *Sovremennye nauchno-prakticheskie reshenija v APK: jelektronnyj sbornik statej – Modern decisions of scientific and practice problems in APC: Electronic collected articles*, P.212 [in Russian].
4. Shewen P.E. & Wilkie B.N. (1985) Evidence for the Pasteurella haemolytica cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am. J. Vet. Res.*, 46(5), 1212 [in English].
5. Thumbikat P., Dileepan T., Kannan M.S. & Maherswaran S.K. (2005). Characterisation of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica Leukotoxin integration with bovine alveolar macrophage beta2 integrins. *Vet. Res.*, 36, 771 [in English].
6. Zecchion L., Felt T. & Desmecht D. (2005) How Mannheimia haemolytica defeats host defence through a kiss of a death mechanism. *Vet. Res.*, 36(2), 133. [in English].
7. Clinkenbeard K.D., Mosier D.A. & Confer A.W. (1989) Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by Pasteurella haemolytica leukotoxin. *Infection and immunity.*, 57, 420 [in English].
8. Confer A.W., Ayalew S., Montelongo M., et.al. (2009) Immunity of cattle following vaccination with a Mannheimia haemolytica chimeric P1pE-LKT (SAC89) protein. *Vaccine*, 27, 1771 [in English].
9. Oppermann T., Busse N. & Czenak P. (2017) Mannheimia haemolytica growth and leukotoxin production for vaccine manufacturing. – A bioprocess review. *Electronic journal biotechnology.*, 28, 95 [in English].

УДК 577.1:591.11:[546.56/.57+546.72+546.714-31]-022.532:636.52/.58

**ОРОБЧЕНКО О.Л.**, д-р. вет. наук, ст. наук. сп., toxi-lab@ukr.net

**РОМАНЬКО М.Є**, канд. біол. н., ст. наук. сп., marina\_biochem@ukr.net

**КУЦАН О.Т.**, д-р. вет. наук, проф., чл.-кор. НААН, okutsan@ukr.net

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна*

## **КЛІНІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ДОБОВИХ КУРЧАТ ЗА УМОВ ТРАНСОВАРІАЛЬНОЇ ДІЇ НАНОКОМПОЗИТУ МЕТАЛІВ (Ag, Cu, Fe, MnO<sub>2</sub>) У ПОРІВНЯННІ З СОЛЯМИ МЕТАЛІВ**

*У результаті досліджень клінічних показників крові добових курчат за умов трансваріальної дії наноконпозиту металів (НкМе: Ag, Cu, Fe, MnO<sub>2</sub>) в порівнянні з солями відповідних металів встановлено, що введення солей металів призводить до зниження вмісту загального гемоглобіну в середньому на 9,8 % (P<0,05) на фоні фізіологічних значень кількості еритроцитів і лейкоцитів у крові курчат. Уведення НкМе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла призводить до підвищення кількості еритроцитів та вмісту загального гемоглобіну в середньому на 35,6 і 10,2 % (P<0,05), а у дозі 4,0 мг/кг маси тіла – лише загального гемоглобіну на 9,9 % (P<0,05). Введення до раціону курей-несучок добавки НкМе у обох дозах не впливає на рівень лейкоцитів у крові добових курчат, що вивелись.*

**Ключові слова:** добові курчата, наноконпозит металів, солі металів, клінічні показники крові.