

УДК 619 : 616.98:579.84:636.95(078)

Яненко У. М., к.вет.н., ст. науковий співробітник ©**Яненко В. М.**, науковий співробітник

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

АНАЛІЗ МЕТОДІВ ДІАГНОСТИКИ ПАСТЕРЕЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ І СВИНЕЙ

*У статті висвітлені методи діагностики пастерел від великої рогатої худоби і свиней при бронхопневмоніях та інфекційному атрофічному риніті, також дослідження патологічного матеріалу від вимушено забитих і загиблених тварин з попереднім діагнозом – бронхопневмонія. Провели порівняння між ПЛР, ІФА і класичними бактеріологічними дослідженнями по ізоляції *P. multocida* від сільськогосподарських тварин.*

Ключові слова: пастерельоз, діагностика, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз, бактеріологічні дослідження, серовари, штам.

У структурі інфекційних хвороб пастерельоз тварин в Україні до 2000 року посідав п'яте місце після колибактеріозу, дизентерії, сальмонельозу, бешихи. У період 2005–2011 рр. пастерельоз часто супроводжує респіраторні хвороби і займає серед інфекційних захворювань третє місце.

Лабораторна діагностика пастерельозу сільськогосподарських тварин на даний момент є досить складною через те, що як моноінфекція не реєструється на території України і він перебігає в асоціації з іншими збудниками. Пастерельозна інфекція часто перебігає в асоціації з інфекційним ринотрахеїтом ВРХ, класичною чумою свиней, цирковірусною інфекцією другого типу (*PRDC 2*), репродуктивно-респіраторним синдромом свиней (*PRRS*), мікоплазмозами ВРХ і свиней, бордетельозом. Хвороби змішаної етіології зумовлюють непередбачувану загибель сільськогосподарських тварин. Частота виділення пастерел від тварин, які мають клінічні ознаки пневмоній, досягає 75–87 % [1, 2, 3, 4].

Єдиним поширеним методом лабораторної діагностики пастерельозу тварин є бактеріологічний метод. На жаль, усі ці дослідження досить громіздкі та тривалі [5,6].

Лабораторна діагностика інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин і людини поповнюється сучасними методами, такими як імуноферментний аналіз (ІФА) та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), проте ці методи ще не набули широкого застосування в Україні. Необхідно враховувати, що головним аспектом серед заходів боротьби пастерельозу є своєчасна діагностика та виявлення тварин-пастерелоносіїв.

Мета – порівняння методів ізоляції збудника пастерельозу великої рогатої худоби і свиней та впровадження їх у схему оздоровчо-профілактичних заходів проти пастерельозної інфекції.

Матеріали та методи.

У роботі використовували клініко-епізоотологічні бактеріологічні, серологічні (РА, РНГА та ІФА), молекулярно-генетичні (ПЛР) та статистичні методи Microsoft Excel.

Робота виконувалась протягом 1997–2010 рр. у лабораторії ветеринарно-санітарної експертизи Інституту ветеринарної медицини НААН, лабораторії бактеріології Центральної державної лабораторії ветеринарної медицини, в лабораторії молекулярної діагностики і ІФА ДНКІБШМ, м. Києва.

Для проведення наукових досліджень були використані референтні та епізоотичні штами пастерел.

Для діагностики пастерельозу в ПЛР нами були проведені дослідження із розробленими парами праймерів: для *P. multocida* серовару А САРА-FWD САРА-REV; для серовару В САРВ-FWD САРВ-REV; для серовару D САРД-FWD САРД-REV, також спільну пару праймерів, що кодує рід *P. multocida* КМТ-1. ПЛР проводили в три основні етапи: виділення ДНК із біопроби, безпосередньо ПЛР (ампліфікації) та реєстрації результатів за допомогою електрофорезу.

Бактеріологічні дослідження проводили згідно з "Настановою з лабораторної діагностики пастерельозів тварин та птиці" [7] і включали в себе мікроскопію мазків та мазків-відбитків із патологічного матеріалу, культуральні (пасажування виділених культур на поживних середовищах (4–5 разів)) та вивчення біохімічних властивостей, трипаново-флюоресцентна проба, біопроби та серотипізації на білих мишах (за Картером).

Проводили непрямий варіант твердофазного ІФА з використанням набору діагностикумів. Застосовувалась тест-система НДІ епідеміології та мікробіології ім. М. Ф. Гамалеї (Росія), де використовуються імуноглобуліни проти IgG тварин, мічені пероксидазою. Фон, або рівень порогу, вище якого сироватку оцінювали як позитивну для *P. multocida*, становив 575 (Каширин В. В., 1989).

Реакцію аглютинації (РА) та реакцію непрямой гемаглютинації (РНГА) ставили з метою виявлення антитіл до пастерельозного антигену в сироватці крові телят і свиней. Використовували антиген, який виготовляли з референтних музейних штамів *P. multocida*, одержаних із ВДНКІ ветпрепаратів МСГ РФ. Проводили гіперімунізацію кролів референтними штамми *P. multocida* трьох сероварів: А, В і D, для одержання специфічних сироваток для постановки РНГА.

Результати досліджень. При виконанні роботи нами були досліджені тваринницькі господарства різних областей України, які вважались благополучними щодо пастерельозної інфекції. Але в них реєструються захворювання органів дихання як вірусної, так і бактеріальної етіології (парагрип-3, респіраторна форма хвороби Ауескі, інфекційний вірусний

ринотрахеїт (ІВР), цирковірусна інфекція, мікоплазмоз, гемофіліоз, бордетельоз, інфекційний атрофічний риніт (ІАР), легеневий прояв хламідіозу тощо).

У ході нашої багаторічної роботи пастерели виділялись від свиней з ознаками інфекційного атрофічного риніту, від ВРХ за бронхопневмоній, бурситах та абортгах

Виявлення *P. multocida* у свиней з ознаками інфекційного атрофічного риніту. З метою індикації *P. multocida* з трьох господарств було відібрано зразки слизу носової порожнини та проби з мигдаликів (заглоткових) від загиблих та вимушено забитих свиней, хворих на інфекційний атрофічний риніт (ІАР) (по 30 проб кожного дослідженого матеріалу).

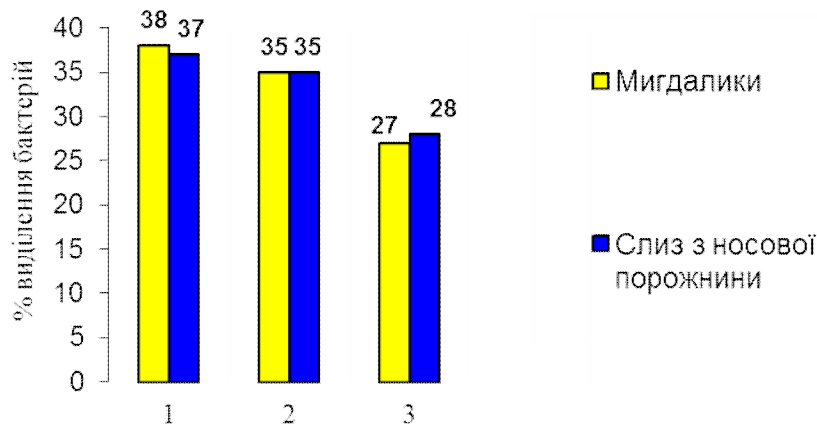


Рис. 1. Співвідношення кількості *P. multocida* з мигдаликів виділених від загиблих тварин і слизу носової порожнини від хворих на ІАР свиней (1 – КСГАП «Новогригорівка»; 2 – ТОВ «Союз»; 3 – ТОВ «Рута»).

У результаті проведених досліджень було встановлено, що індикація *P. multocida* з мигдаликів та зі слизової оболонки носової порожнини майже однакова (рис. 2). У КСГАП „Новогригорівка” пастерелу виділяли бактеріологічними методами з мигдаликів у 38,0 % випадків, із слизу носової порожнини – 37,0 % випадків; у ТОВ “Союз” пастерелу виділено з мигдаликів і слизу носової порожнини у 35,0 % випадків; у СВК “Рута” відповідно у 27,0 % і 28,0 % випадків.

Дослідження крові свиней ($n = 31$), хворих на ІАР, виявили в ПЛР присутність ДНК *P. multocida* таких сероварів: А – $5,7 \pm 0,6$ (90,12 %) випадків та D у $6 \pm 0,6$ (92,6 %) випадків.

За допомогою ІФА антитіла виявлені у 18 випадках (60,0 %), титри проб крові в ІФА були до 1 : 460. Отже, у дослідних зразках концентрація антитіл

була низькою відносно порогу патогенності, що підтверджує циркуляцію збудника серед сприйнятливих тварин.

Застосування ПЛР для прижиттєвого виявлення збудника пастерельозу від великої рогатої худоби. З метою виявлення присутності збудника пастерельозної інфекції проводили дослідження проб крові від 125 голів телят з 5 господарств чотирьох областей України (Київської, Миколаївської, Чернігівської та Херсонської). Усі тварини мали ознаки респіраторних захворювань різного ступеня тяжкості, тоді як обстежені господарства офіційно були благополучними щодо пастерельозу. Результати ПЛР-аналізу свідчать, що із 125 проб слизу носової порожнини були виявлені у 97 (77,6 %) випадках пастерели, більшість з яких належали до серовару А – 52 (53,6 %) та до серовару D – 39 (40,2 %) випадків ($p \geq 0,005$).

З метою порівняння чотирьох методів діагностики пастерельозу було відібрано 20 проб крові від телят з СТОВ “Промінь” Арбузинського району Миколаївської області. Цей матеріал досліджено у ПЛР, бактеріологічним методом, ІФА, РА і РНГА. В результаті отримали такі дані: в 19 (95,0 %) випадках виявлено ДНК-фрагмент *P. multocida* за допомогою ПЛР; при бактеріологічному методі – 14 випадках (70,0 %), виявлення антитіл до *P. multocida* в ІФА – 13 (65,0 %) випадках, а в РА – 10 випадках (50,0 %) і РНГА – 14 випадках (70,0 %) (рис. 4).

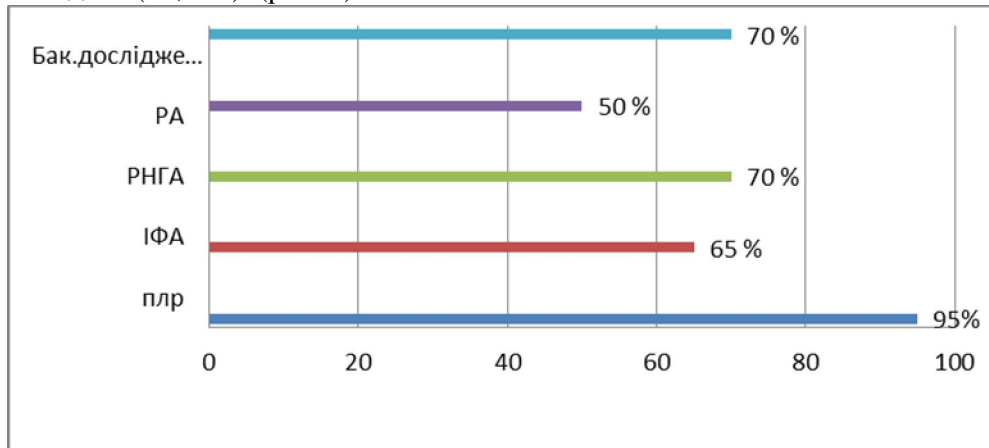


Рис. 2. Порівняльна ефективність методів індикації *P. multocida* в пробах крові телят, хворих на бронхопневмонію.

Дослідженнями крові телят ($n = 20$), хворих на бронхопневмонію, виявили в ПЛР-тесті присутність *P. multocida* таких сероварів: А – 8 (40,0 %) випадків та D – 12 (60,0 %) випадків.

За методом Картера, у хворих телят було визначено *P. multocida* серовару А – у 4 випадках (20,0 %), а серовару D – у 8 випадках (40,0 %), що свідчить про нижчу чутливість проведеної діагностики, ніж ПЛР. Таким чином, проведення

внутрішньовидової диференціації сероварів *P. multocida* за допомогою ПЛР досить швидко і ефективно.

Застосування методу ПЛР для прижиттєвого виявлення збудника пастерельозу від свиней, хворих на бронхопневмонію.

Для порівняння ефективності чотирьох методів діагностики пастерельозу, було відібрано 20 проб крові від поросят на відгодівлі з КСП „Трубіж” Баришівського району Київської області, хворих на бронхопневмонію (рис.5).

Отримані результати свідчать, що застосування ПЛР для виявлення ДНК збудника пастерел при респіраторних захворюваннях у свиней становить 91,0 %, індикація бактерій бактеріологічним методом досліджень становить – 80,0 %, виявлення антитіл в ІФА – 53,3 % (титри від 1 : 128 до 1 : 412), РНГА – 75,0 % та РА – 46,7 % позитивних проб.

При проведенні за допомогою ПЛР внутрішньовидової диференціації пастерел, виділених при бронхопневмонії свиней, отримали таку картину: до серовару А віднесено 11 (55,0 %) штамів, серовару D – 9 (45,0 %) із загальної кількості 20 штамів.

Порівняння методів індикації *P. multocida* в патологічному матеріалі ВРХ і свиней. Протягом 2001–2004 рр. провели 248 бактеріологічних досліджень патологічного матеріалу від загиблих і вимушено забитих тварин (ВРХ – 104 і свиней – 140 проб) із попереднім діагнозом – ураження органів дихання. У цьому разі виділено 177 культур мікроорганізмів. З них до *P. multocida* віднесено 62 культури (35,5 %).

Найбільший відсоток пастерел при бактеріологічному дослідженні виділявся з легень (94,7 %) та лімфатичних вузлів (38,8 %) (підщелепових, заглоткових, бронхіальних, середостінних), рідше – з серця і печінки (22,3 – 23,0 %).

При дослідженні патологічного матеріалу від ВРХ (n = 50) позитивний результат індикації *P. multocida* за допомогою ПЛР одержали у 49,3 випадках (98,6 %), а від свиней (n = 50) – у 49,7 випадках (99,4 %); в той час за допомогою бактеріологічних досліджень *P. multocida* виділялась відповідно у 41 (82,0 %) та 44 (89,4 %) випадках. У процесі проведення серотипізації виділених штамів пастерел на білих мишах одержали результати, що збігаються з даними ПЛР-аналізу. Було встановлено, що до *P. multocida* серовару А належить 38 (61,3 %) культур, а до *P. multocida* серовару D – 24 (38,7 %). Таким чином, обидва методи серотипізації виявились ефективними, але результати за допомогою ПЛР одержали за 5 годин, тоді як для проведення серотипізації на білих мишах треба до трьох діб.

Результати, одержані при виконанні роботи, дають можливість провести паралель між класичними методами діагностики пастерельозу тварин, якими оперують державні ветеринарні лабораторії, а саме: культурального, мікроскопічного, біохімічного й серологічного від РА та сучасними методами ІФА та полімеразної ланцюгової реакції у різних аспектах. Це дає можливість порівняти їх та оцінити.

У всіх лабораторних довідниках, настановах, рекомендаціях і підручниках наводиться метод виділення та культивування пастерел на живильних середовищах, вивчення їхніх біохімічних властивостей (проведення через строкатий ряд), серотипізація на білих мишах. Усе це ми враховували при проведенні дослідження клінічного та патологічного матеріалів від тварин (ВРХ і свиней).

Висновки.

Метод бактеріологічних досліджень (мікроскопія, культивування, біопроба, стафілококовий тест, серозахист на білих мишах) досить трудомісткий. До того ж на кожен пробу патологічного матеріалу треба використовувати до п'яти мишей. Результати бактеріальних досліджень за своєю ефективністю практично не відрізнялись від ПЛР, але значно дешевші.

Об'єктивність лабораторного дослідження *P. multocida* залежить від ізоляції та ідентифікації підозрілих колоній бактерій за допомогою мікроскопії й біохімічних досліджень. Під час польових досліджень стану носійства ізоляція *P. multocida* досить складна, коли зразки беруть із контамінованого органа тварини, наприклад, із носа, горла. Екстенсивне субкультивування необхідне для отримання чистої культури збудника. Крім того, складність отримання антисироваток і час, необхідний для процедури серотипування *P. multocida*, свідчать, що серологічне визначення не практичне для більшості лабораторій країни. Це призводить до збільшення періоду між відбиранням патологічного матеріалу та серологічною ідентифікацією, особливо, якщо матеріал тривалий час транспортують до лабораторії.

При порівнянні ПЛР і бактеріальних досліджень найбільшою перевагою першого методу є швидке отримання кінцевого результату, але перевірений часом класичний бактеріологічний метод діагностики дає повну інформацію про збудник пастерельозу: патогенний чи апатогенний, визначення ЛД₅₀ який титр у РНГА чи РА, визначення персистенції і резистенції *P. multocida* до антибіотичних та дезінфікуючих препаратів, тощо.

Література

1. Волинець Л. К. Поширення, економічні збитки та профілактика пастерельозу свиней / Л. К. Волинець, Т. В. Мазур, В. І. Москалюк // Вет. медицина України. – 1997. – № 8. – С. 16–17.
2. Факторні хвороби сільськогосподарських тварин / В. П. Литвин [та ін.] ; за ред. В. П. Литвина, Л. Є. Корнієнка. – К.: Аграр. наука, 2002. – С. 292–363.
3. Carty D. H. Preventing atrophic rhinitis, erysipelas and pasteurellosis in pigs / D. H. Carty, D. B. Porter, J. J. Duglass, C. A. Slusser // Vet. Med. (Edwardville). – 1986. – Vol. 81, № 12. – P. 1169–1174.
4. Thomson R. Investigation of Factors of Probabl significance in Patogenesis of Pneumonic Pasteurellosis in Cattle / R. Thomson // Can. J. Comp. Mol. – 1975. – Vol. 39, № 2. – P. 205–207.
5. Leesley B. A. Saline – extracted antigens of *Past. multocida*: separation by chromatofocusing, preliminary characterization and evaluation of immuno-genicity /

B. A. Leesley, A. W. Cofner, D. F. Vosier // Vet. Immunopathol. – 1985. – Vol. 7, № 23. – P. 279 – 296.

6. Foged, N. T. Pasteurella multocida toxin. The characterization of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs / N. T. Foged // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. – 1992. – № 100 (Suppl. 25). – P. 1 – 56.

7. Настанова з лабораторної діагностики пастерельозу тварин та птиці/ О. І. Сосницький, В. П. Заболотна, А. А. Руденко, А. Ф. Руденко, Б. Т. Стегній, А. Ф. Бабкін, В. О. Ушкалов, А. М. Головка, В. Г. Скрипник, Л. М. Давидовська, П. П. Сімох, В. І. Сікачина, А. В. Абрамов, Г. М. Данісюк, Л. К. Волинець, У. М. Яненко, В. Ю. Кассіч, Г. О. Міланко, Н. О. Авраменко. – Харків, 2007. – 12 с.

8. Каширин В. В. Иммуногенные свойства штаммов Pasteurella multocida / В. В. Каширин // Ветеринария. – 1989. – № 5. – С. 25 – 27.

Summary

In this article the methods of diagnostics of Pasteurella from cattle and pigs with bronchopneumonia and infectious atrophic rhinitis are described, as well as the study of pathologic material from the killed and succumbed animals with a preliminary diagnosis – bronchopneumonia. The comparison between PCR, ELISA and conventional bacteriological methods of isolation of P. multocida from farm animals was carried out.

Key words: *Pasteurellosis, diagnostics, polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay, bacteriological studies, serovars, strain*

Рецензент – д.вет.н., професор Слівінська Л.Г.